

Université de Montréal

**L'effet de la surexpression du récepteur de type 1 à
l'angiotensine II sur les courants potassiques et
calciques au niveau des oreillettes**

par
François Huynh

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Août 2014

© François Huynh, 2014

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

L'effet de la surexpression du récepteur de type 1 à l'angiotensine II sur les courants
potassiques et calciques au niveau des oreillettes

présenté par:

François Huynh

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Éric Rousseau, président-rapporteur

Dre Céline Fiset, directrice de recherche

Dre Anique Ducharme, membre du jury

Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche Dre Céline Fiset pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir et de participer à la recherche fondamentale en cardiologie.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire pour leur aide indispensable et leur soutien moral, soit Nathalie Éthier, Annie Douillette, Anh-Tuan Ton, Sophie Mathieu, Nabil El Khoury, Jenna Ross et Marie-Ève Matte.

Je voudrais remercier les membres de mon comité aviseur, le Dre Anique Ducharme, le Dre Lucie Parent et le Dr Éric Rousseau, pour m'avoir aidé à orienter mes projets.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ma maîtrise.

Résumé

Le système rénine-angiotensine est impliqué dans le remodelage structural et électrique caractérisant la fibrillation auriculaire (FA). L'angiotensine II (ANG II) induit le développement de fibrose et d'hypertrophie au niveau des oreillettes, prédisposant à la FA. Or, les mécanismes électrophysiologiques par lesquels l'ANG II pourrait promouvoir la FA sont peu connus.

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer l'effet de l'ANG II sur les courants potassiques et calciques au niveau auriculaire indépendamment du remodelage structural. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de patch-clamp avec un modèle de souris surexprimant le récepteur de type 1 à l'angiotensine II (AT₁R) spécifiquement au niveau cardiaque. Pour distinguer les effets directs de la surexpression d'AT₁R des effets induits par le remodelage cardiaque, nous avons étudié des souris âgées de 180 jours, qui présentent du remodelage structural, et des souris âgées de 50 jours, qui n'en présentent pas.

Des études précédentes sur ce modèle ont montré qu'au niveau des myocytes ventriculaires, l'ANG II réduit le courant potassique global (I_{peak}) et rectifiant entrant (I_{K1}) ainsi que le courant calcique de type L (I_{CaL}). Ainsi, notre hypothèse est que l'ANG II modulera aussi ces courants au niveau auriculaire, pouvant ainsi augmenter l'hétérogénéité de repolarisation auriculaire et de ce fait le risque de développer et maintenir la FA.

Nous avons observé une diminution significative de la densité d' I_{K1} dans l'oreillette gauche des souris transgéniques sans changement d' I_{peak} . De plus, la densité d' I_{CaL} n'est pas réduite chez les souris transgéniques âgées de 50 jours.

En conclusion, l'effet de l'ANG II sur les courants potassiques et calciques semble dépendre de la chambre cardiaque. En effet, nous savons que l'ANGII réduisait I_{peak} , I_{K1} et I_{CaL} au niveau ventriculaire, mais nos résultats ont montré qu'il ne les affectait pas directement au niveau des oreillettes. Ceci suggère des mécanismes de régulation impliquant des voies de signalisation distinctes selon les chambres cardiaques. Enfin, nos résultats montrant l'absence de l'influence directe de la surexpression d'AT₁R sur les

canaux K^+ et Ca^{2+} au niveau des myocytes auriculaires renforcent l'importance d'approfondir nos connaissances sur les effets de l'angiotensine II sur le développement de la fibrose, sur le remodelage structurel et sur la conduction électrique cardiaque.

Mots clés : angiotensine II, courant calcique, courant potassique, oreillette, insuffisance cardiaque, fibrillation auriculaire

Abstract

The renin-angiotensin-aldosterone system contributes to the structural and electrical remodelling that characterise atrial fibrillation (AF). Angiotensin II (ANG II) induces fibrosis and hypertrophy in the atrium, creating a substrate for AF development. Whether or not ANG II promotes electrophysiological remodelling in the atrium and by which mechanisms is not known.

The objective of this research project is to evaluate the effect of ANG II on potassium and calcium currents in atrial myocytes independently of structural remodelling. We used the patch-clamp technique to measure ionic currents in a mouse model overexpressing the angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) locally in the heart. To differentiate the direct effects of AT₁R overexpression with those related to structural remodelling, we studied mice aged of 180 days that are characterised by structural remodelling and mice aged of 50 days that aren't.

Previous studies have shown that this mouse presented with reduced total potassium current (I_{peak}) and inward rectifier potassium current (I_{K1}) as well as with a decrease in L-type calcium currents (I_{CaL}) in ventricular myocytes. Therefore, our hypothesis was that ANG II would also regulate those currents at the atrial level, possibly leading to an increase in heterogeneity in atrial repolarisation and to an increase in AF initiation and maintenance.

We show in this project a significant reduction of the I_{K1} in the left atrium of transgenic mice without any changes of the I_{peak} . Furthermore, we show no modulation of I_{CaL} density in 50 days old transgenic mice.

We conclude that ANG II effect on potassium and calcium currents depends on the cardiac chamber. Indeed, although we already knew ANG II reduced I_{peak} , I_{K1} and I_{CaL} in ventricular myocytes of transgenic mice, in this project we found ANG II did not affect I_{peak} and I_{CaL} at the atrial level. These findings suggest distinctive regulation pathways by which ANG II affects the different cardiac chambers. Furthermore, the absence of direct influence of ANG II on potassium and calcium currents in atrial myocytes reinforces the

importance to better understand ANG II's effect on cardiac fibrosis development, structural remodelling and electric conduction.

Keywords : angiotensine II, calcium courant, potassium courant, atrial, heart failure, atrial fibrillation

Table des matières

Remerciements.....	iii
Résumé.....	iv
Abstract.....	vi
Table des matières.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Introduction.....	14
L'insuffisance cardiaque.....	14
La fibrillation auriculaire.....	16
Le lien entre l'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire.....	21
Le rôle du SRAA en insuffisance cardiaque et en fibrillation auriculaire.....	24
Le potentiel d'action auriculaire chez la souris et les courants ioniques.....	26
La souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 à l'angiotensine II spécifiquement au niveau des myocytes cardiaques.....	27
Hypothèse.....	31
Objectifs.....	31
Méthodes.....	32
Isolation de myocytes auriculaires.....	32
Électrophysiologie cellulaire.....	33
Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR).....	35
Analyse statistique.....	35
Résultats.....	36
Caractérisation du modèle transgénique.....	36
Les effets de la surexpression d'AT ₁ R sur les courants potassiques.....	36
Les effets de la surexpression d'AT ₁ R sur les courants calciques.....	45
Différences de repolarisation mâles/femelles.....	46
Discussion.....	54
Résumé des principaux résultats.....	54

Le modèle AT ₁ R	54
L'effet de la surexpression d'AT ₁ R sur les courants potassiques	55
L'effet de la surexpression d'AT ₁ R sur I _{CaL}	58
L'effet de la surexpression d'AT ₁ R sur I _{CaT}	58
Les différences de l'effet de l'angiotensine II entre les oreillettes et les ventricules ...	60
Les différences mâles/femelles	61
Autres facteurs d'insuffisance cardiaque qui prédisposent à la fibrillation auriculaire	63
Perspectives cliniques	64
Bibliographie.....	65

Liste des figures

Figure 1. La souris AT ₁ R présente une surexpression du récepteur de type 1 à l'angiotensine II spécifiquement au niveau des myocytes cardiaques et est caractérisée par une hypertrophie auriculaire et ventriculaire.....	28
Figure 2. La surexpression d'AT ₁ R diminue la densité d'I _{to} , d'I _{Kur} et d'I _{CaL} dans les myocytes ventriculaires de souris âgées de 50 jours.....	30
Figure 3. Expression relative d'ARNm d'AT ₁ R dans les myocytes d'oreillettes de souris âgées de 180 jours.....	37
Figure 4. Capacitance cellulaire des myocytes d'oreillettes chez les souris transgéniques âgés 180 jours.....	38
Figure 5. Concentration plasmatique d'angiotensine II chez les souris transgéniques et contrôles âgées de 50 jours et de 180 jours obtenue par Elisa.....	39
Figure 6. Absence de différence de densité de courant pour I _{peak} entre les myocytes d'oreillettes gauches et droites de souris contrôles, mais réduction de la densité de courant d'I _{K1} dans l'oreillette gauche.....	42
Figure 7. Réduction de la densité de courant d'I _{K1} au niveau des myocytes d'oreillettes gauches de souris transgéniques âgées de 180 jours.....	43
Figure 8. Absence de différence de densité de courant pour I _{peak} entre les myocytes d'oreillettes droites de souris transgéniques et contrôles âgées de 180 jours.....	44

Figure 9. La surexpression d'AT ₁ R diminue la densité d'I _{CaL} et la quantité relative d'ARNm de Ca _v 1.2 dans les myocytes auriculaires de souris âgées de 180 jours.....	48
Figure 10. La surexpression d'AT ₁ R n'affecte pas la densité d'I _{CaL} ni la quantité relative d'ARNm de Ca _v 1.2 et Ca _v 1.3 dans les myocytes auriculaires de souris âgées de 50 jours.....	49
Figure 11. Absence de modulation des cinétiques d'activation et d'inactivation d'I _{CaL} au niveau des myocytes auriculaires entre les souris contrôles et transgéniques âgées de 180 jours	50
Figure 12. La surexpression d'AT ₁ R réduit la densité de courant d'I _{CaT} et la quantité relative d'ARNm de Ca _v 3.2 dans les myocytes d'oreillettes de souris âgées de 50 jours.....	51
Figure 13. La surexpression d'AT ₁ R réduit la densité de courant d'I _{CaT} et la quantité relative d'ARNm de Ca _v 3.2 dans les myocytes d'oreillettes de souris âgées de 180 jours.....	52
Figure 14. Absence de différence de densité d'I _{peak} entre les myocytes auriculaires de souris CD1 mâles et femelles.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des courants potassiques présents dans les myocytes auriculaires entre la souris et l'homme.....	27
Tableau 2. Liste des amorces utilisées pour le qPCR.....	35

Liste des abréviations

4-AP: 4-aminopyridine

AT₁R: récepteur de type I à l'angiotensine II

AT₂R: récepteur de type 2 à l'angiotensine II

ARA : antagoniste du récepteur à l'angiotensine II

Ca²⁺: ion calcium

Cx40: connexines 40

Cx43: connexines 43

DAD: dépolarisation retardée ("delayed afterdepolarization")

EAD: dépolarisation précoce ("early afterdepolarization")

FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche

I_{CaL}: courant Ca²⁺ de type L

I_{CaT} : courant calcique de type T

IECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

I_{K1}: courant K⁺ à rectification entrante

I_{Kr}: composante rapide du courant K⁺ à rectification retardée

I_{Ks}: composante lente du courant K⁺ à rectification retardée

I_{Kur}: courant K⁺ sortant à rectification retardée ultrarapide

I_{Na}: courant Na⁺

I_{to}: courant K⁺ transitoire sortant indépendant du Ca²⁺

K⁺: ion potassium

SRAA: système rénine-angiotensine-aldostérone

Introduction

L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est un syndrome clinique complexe qui résulte de toutes les altérations structurelles ou fonctionnelles du remplissage ou de la contraction ventriculaire. Les manifestations cardinales de l'insuffisance cardiaque sont la dyspnée et la fatigue, qui peuvent limiter la tolérance à l'exercice, et la rétention liquidienne qui peut mener à l'œdème pulmonaire ou périphérique.¹ L'insuffisance cardiaque est associée à de fréquentes hospitalisations, une pauvre qualité de vie et une espérance de vie réduite.² L'incidence de l'insuffisance cardiaque est demeurée stable depuis les dernières décennies, avec environ 650 000 nouveaux cas par année aux États-Unis.¹ Au Canada, la prévalence d'insuffisance cardiaque en 2010 au sein de la population âgée de 40 ans et plus était d'environ 3,5%.³ La prévalence dans la population adulte est d'environ 2% dans les pays développés et augmente avec l'âge, atteignant 6-10% chez les gens âgés de plus de 65 ans. En Amérique du Nord, environ une personne sur cinq développera de l'insuffisance cardiaque après l'âge de 40 ans. Contrairement à d'autres maladies cardiaques, la prévalence de l'insuffisance cardiaque augmente, car (1) les traitements pour les arythmies, les maladies coronariennes et valvulaires s'améliorent et permettent aux patients de vivre plus longtemps et car (2) la proportion des gens âgés augmente.²

Bien que nous pensions que l'insuffisance cardiaque survenait principalement dans un contexte de réduction de la fraction d'éjection du ventricule gauche (FEVG), les études épidémiologiques ont montré qu'environ la moitié des patients insuffisants cardiaques ont une FEVG préservée (FEVG > 40-50%). Ainsi, les patients insuffisants cardiaques sont divisés en deux catégories: avec FEVG réduite ou préservée.

Toute condition qui altère la structure ou la fonction du ventricule gauche peut prédisposer à l'insuffisance cardiaque. Par exemple, les maladies coronariennes athérosclérotiques (MCAS) sont la cause prédominante d'insuffisance cardiaque dans les pays développés. Une surcharge volumique ou de pression chronique causée respectivement par une régurgitation valvulaire ou une hypertension sont deux autres causes fréquentes d'insuffisance cardiaque.² En effet, une histoire d'infarctus du myocarde et l'hypertension sont associées à un risque deux fois plus élevé de développer

de l'insuffisance cardiaque, tandis que les maladies valvulaires sont responsables d'environ 10% des cas d'insuffisance cardiaque.⁴ D'autres facteurs de risque incluent le diabète⁵, l'obésité⁶ et l'apnée du sommeil⁷. Par ailleurs, l'incidence d'insuffisance cardiaque chez les hommes n'a pas changé depuis les 40 dernières années tandis qu'elle a diminué d'un tiers chez les femmes. Cette différence pourrait être due aux différences d'étiologie entre les sexes, notamment l'infarctus du myocarde chez les hommes et l'hypertension chez les femmes.⁸ Parmi les autres causes d'insuffisance cardiaque se retrouvent les malformations congénitales, les dommages induits par les médicaments, les maladies virales et les désordres infiltratifs telle l'amylose ou la sarcoïdose. L'étiologie d'environ 20-30% des cas d'insuffisance cardiaque avec une FEVG réduite est inconnue et est appelée cardiomyopathie idiopathique.⁹ Par ailleurs, les patients avec une insuffisance cardiaque diastolique sont typiquement hypertendus, diabétiques, âgés et de sexe féminin.²

Environ 300 000 américains décèdent annuellement dû à l'insuffisance cardiaque¹⁰ et bien que le taux de mortalité associé à l'insuffisance cardiaque ait diminué depuis les dernières 50 années, le taux de survie à 5 ans demeure près de 50%. La principale cause de décès est la mort subite, impliquant des arythmies ventriculaires chez la plupart des patients.¹¹

Les études randomisées contrôlées chez les patients insuffisants cardiaques ont majoritairement enrôlé des patients insuffisants cardiaques avec une FEVG réduite, et c'est uniquement chez ces patients qu'un bénéfice sur la survie est démontré par les traitements médicamenteux. Le traitement pharmacologique de l'insuffisance cardiaque chez les patients avec une FEVG réduite inclut l'emploi d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA), d'antagonistes du récepteur à l'angiotensine II (ARA), de bêta-bloqueurs, d'antagonistes du récepteur à l'aldostérone, de diurétiques, de nitrates combinée à l'hydralazine et de la digoxine.¹

L'insuffisance cardiaque avec une FEVG réduite peut être perçue comme un désordre progressif qui survient suite à un événement qui endommage le muscle cardiaque, résultant à la perte de myocytes cardiaques, ou qui l'empêche de se contracter normalement. L'évènement index peut survenir abruptement comme lors d'un infarctus du myocarde ou bien de manière graduelle comme lors d'une surcharge de pression

chronique. Peu importe la nature de cet événement, il aboutit au déclin de la capacité du cœur à pomper le sang. S'ensuit une série de mécanismes compensatoires qui s'activent pour maintenir un débit cardiaque suffisant. Celle-ci inclut (1) l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) qui est responsable de la rétention hydro-sodique, d'une augmentation de la pré-charge et d'une augmentation du volume d'éjection par le mécanisme de Frank-Starling (2) l'activation du système nerveux autonome (SNA) qui est responsable de l'augmentation de la force de contraction myocardique et de la tachycardie, (3) la vasoconstriction et (4) l'hypertrophie ventriculaire et le remodelage cardiaque.² De plus, plusieurs molécules vasodilatrices sont activées telles que l'ANP, le BNP, certaines prostaglandines (PGE₂ et PGI₂) et l'oxyde nitrique (NO), ce qui diminue la vasoconstriction périphérique excessive.⁹

L'activation du SRAA mène à la synthèse et la sécrétion d'angiotensine II et d'aldostérone. L'angiotensine II augmente la résistance vasculaire systémique par une vasoconstriction directe et par la relâche de l'hormone antidiurétique (ADH) et d'endothéline-1. L'ANG II facilite également la relâche de norépinéphrine, activant davantage la stimulation du SNA. L'ANG II promouvoit la rétention hydro-sodique par la relâche d'aldostérone et finalement, il joue un rôle central dans la stimulation de l'hypertrophie ventriculaire, le remodelage, l'apoptose myocytaire et l'altération de la matrice extracellulaire. L'aldostérone, en plus d'augmenter la rétention hydro-sodique, peut directement affecter le cœur. Elle favorise la fibrose en augmentant la déposition de collagène dans la matrice extracellulaire cardiaque. L'aldostérone pourrait augmenter le risque d'arythmie ventriculaire par plusieurs mécanismes dont la création de circuits de réentrée par le développement de la fibrose, l'inhibition de la recapture de norépinephrine cardiaque et la déplétion de potassium et de magnésium intracellulaire.²

La fibrillation auriculaire

La fibrillation auriculaire est l'arythmie soutenue la plus fréquemment rencontrée en clinique, affectant plus de 2,2 millions personnes aux États-Unis.¹² Elle est associée à une qualité de vie réduite, un taux d'hospitalisation élevé et un risque accru de mortalité.¹³ Le coût annuel directement lié au traitement de la fibrillation auriculaire aux États-Unis est estimé à plus de 6 milliards.¹⁴ La prévalence de la fibrillation auriculaire

augmente avec l'âge et atteint 9% chez les gens âgés de 80 ans.¹⁵ De plus, étant donné que plusieurs patients atteints de fibrillation auriculaire sont asymptomatiques, la prévalence globale de fibrillation auriculaire pourrait être le double du nombre précédemment rapporté.¹⁶ La fibrillation auriculaire est caractérisée par une activation anarchique, rapide (entre 400 et 600 battements par minute) et irrégulière des oreillettes. La fréquence cardiaque moyenne varie typiquement entre 120 et 160 battements par minute. La fibrillation auriculaire peut être catégorisée de la manière suivante : fibrillation auriculaire aigue (début depuis moins de 48 heures), paroxystique (se termine spontanément en moins de 7 jours), persistante (dure plus de 7 jours et ne se termine pas spontanément) et permanente (ne se termine pas malgré une cardioversion chimique ou électrique).⁹

Le mécanisme d'initiation et de maintien de la fibrillation auriculaire semble être dû à l'interaction entre des éléments déclencheurs et la présence d'un substrat qu'est l'anatomie complexe des oreillettes. La région autour de l'orifice des veines pulmonaires dans l'oreillette gauche semble être favorable aux réentrées.⁹ Ceci expliquerait le succès des procédures qui isolent cette région par ablation. Par ailleurs, dans certains cas les causes de fibrillation auriculaire sont bien définies comme lors d'une hyperthyroïdie aigue, d'un épisode vagotonique aigu, d'une intoxication alcoolique aiguë, d'une chirurgie ou d'une chirurgie thoracique majeure.^{2,9}

Parmi les facteurs de risque associé à la fibrillation auriculaire se retrouvent une histoire d'infarctus du myocarde, de maladie valvulaire¹⁷, d'hypertension¹⁸, de diabète¹⁹, d'obésité²⁰ et d'apnée du sommeil²¹.

Les symptômes associés à la fibrillation auriculaire varient beaucoup d'un patient à l'autre. Plusieurs patients demeurent asymptomatiques, tandis que certains ressentent des palpitations mineurs ou des irrégularités dans leur pouls tandis que plusieurs autres ont des palpitations sévères. Des symptômes d'angine, d'hypotension, de congestion pulmonaire peuvent également survenir chez certains patients.⁹

A cause de la stase qui survient au niveau des oreillettes et de la faible adhérence murale des thrombus, les patients atteints de fibrillation auriculaire ont un risque accru d'événements thromboemboliques. Environ 15-20% de tous les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont attribuables à la fibrillation auriculaire. Les facteurs de risque

associés aux événements thromboemboliques sont l'âge, des antécédents d'AVC ou d'ischémie cérébrale transitoire (ICT), d'insuffisance cardiaque, de diabète et d'hypertension.²

Parmi les traitements non-pharmacologiques de la fibrillation auriculaire se trouvent l'intervention de Maze, l'isolation de la veine pulmonaire et l'ablation du nœud auriculo-ventriculaire avec implantation d'un pacemaker bi-ventriculaire. L'intervention de Maze, une chirurgie à cœur ouvert, consiste à inciser l'oreillette en plusieurs parties pour interrompre les voies de réentrées. Le taux d'efficacité dans la population générale est excellent, soit 10% de récurrence de fibrillation auriculaire à 10 ans post-intervention.²² Dans une récente étude menée sur des patients atteints de fibrillation auriculaire paroxystique et persistante, l'isolation de la veine pulmonaire par ablation a permis d'augmenter la fraction d'éjection et d'améliorer la qualité de vie des patients. Après 6 mois post-intervention, 78% des patients n'avaient pas de récurrence et aucun cas de décès péri-opératoire n'a été rapporté.²³ Cependant, une étude plus récente menée uniquement chez des patients atteints de fibrillation auriculaire persistante a montré que seul 27% des patients n'avaient pas de récurrence après 2 ans de suivi et une seule intervention.²⁴ Ainsi, la valeur de l'ablation est limitée par le haut taux de récurrences et le besoin fréquent de procédures multiples ainsi que par la complexité de l'intervention, son coût dispendieux et son inaccessibilité.²⁵

Une large étude randomisée, contrôlée et multicentrique, CASTLE-AF (Catheter Ablation vs Standard Conventional Treatment in Patients With Left Ventricular Dysfunction and Atrial Fibrillation) est présentement en cours pour comparer l'efficacité des traitements pharmacologiques versus l'isolation de la veine pulmonaire chez des patients atteints de fibrillation auriculaire et d'insuffisance cardiaque.²⁶ D'ici les résultats de cette étude, les techniques d'ablation demeurent une deuxième ligne de traitement après l'approche pharmacologique pour contrôler la réponse ventriculaire chez les patients souffrant de fibrillation auriculaire et d'insuffisance cardiaque.²⁷

Bien que les agents anti-arythmiques soient considérés en première intention de traitement de la fibrillation auriculaire, plus de 35% des patients traités sous amiodarone, sotalol ou propafénone auront des récurrences après un an²⁸ et entre 10 et 30% des patients auront cessé leurs médicaments à cause d'effets indésirables.²⁹ En effet, la prise

de médicaments anti-arythmiques est liée à un risque accru d'effets indésirables tel que les torsades de pointes et des effets toxiques extracardiaques.³⁰

Il est à noter que les agents anti-arythmiques et les thérapies par ablation sont plus efficaces chez les plus jeunes patients avec de la fibrillation auriculaire paroxystique plutôt que chez les patients plus âgés avec plusieurs facteurs de risque cardiaques et de la fibrillation auriculaire persistante,³¹ possiblement car la fibrillation auriculaire est un désordre hétérogène avec des mécanismes complexes d'initiation et de maintien.³² Les longs épisodes de fibrillation auriculaire sont plus difficiles à terminer à cause des changements induits par les désordres du rythme au niveau des oreillettes. Ainsi, cette arythmie a tendance à devenir de plus en plus persistante dans le temps. Conséquemment, un grand pourcentage des patients avec de la fibrillation auriculaire paroxystique va développer de la fibrillation auriculaire persistante.³³

Il est généralement accepté que le principal mécanisme de la fibrillation auriculaire est la réentrée.² La réentrée peut survenir quand il y a deux voies de conduction alternative à travers des zones interconnectées de tissu avec différentes durées de période réfractaire. Une dépolarisation prématurée peut s'engager dans l'une de ces voies durant sa période réfractaire, causant un bloc unidirectionnel, tandis qu'il peut s'engager dans l'autre voie. L'onde de propagation peut ainsi continuer de circuler autour du circuit indéfiniment, causant un rythme très rapide qui se propage à l'extérieur du circuit à chaque fois que l'onde recircule. Un facteur clé nécessaire à la réentrée est la durée inférieure du temps de conduction autour du circuit comparée à celle de la période réfractaire. Ainsi, la réentrée est favorisée par de courtes périodes réfractaires ou par une réduction de la vitesse de la conduction.²⁵ Dans une étude menée chez des patients avec une fibrillation auriculaire paroxystique ou persistante, une corrélation positive a été observée entre l'expression des canaux calciques de type L et la durée des périodes réfractaires.³³ Ceci est cohérent avec une autre étude qui a montré qu'on remarque chez les patients avec une fibrillation auriculaire persistante ou paroxystique une réduction marquée d'expression protéique de la sous-unité du canal calcique de type L, $Ca_v1.2$.³⁴

Un raccourcissement des périodes réfractaires peut également survenir suite à une augmentation de la conductance potassique. Par exemple, Dobrev et *al.* ont montré une augmentation de la densité d' I_{K1} et d' $I_{K,ACH}$ dans les myocytes auriculaires de patients

souffrant de fibrillation auriculaire chronique par rapport à des patients sains, résultant en une réduction de la durée de potentiel d'action et un potentiel de repos membranaire hyperpolarisé.³⁵ Appuyant ces données, Gaborit et *al.* ont trouvé que les patients atteints de fibrillation auriculaire ont des myocytes auriculaires qui expriment davantage de protéines et d'ARNm codant pour le canal Kir1.2.³⁶ De plus, un modèle de souris surexprimant Kir2.1 spécifiquement au niveau des myocytes cardiaques développe plusieurs troubles arythmiques dont la fibrillation auriculaire.³⁷ $I_{K,ACh}$ médie les effets cardiaques vagues et son activation par l'acétylcholine résulte en une réduction de la durée de potentiel d'action et une hyperpolarisation de membrane cellulaire. Le blocage d' $I_{K,ACh}$ dans des myocytes auriculaires de chien ayant subi un remodelage par tachycardie auriculaire supprime le raccourcissement du potentiel d'action et diminue la promotion d'arythmie.³⁸

D'autres études ont évalué le niveau d'expression des canaux potassiques chez des patients avec de la fibrillation auriculaire paroxystique et persistante. Cependant, elles ont plutôt observé une réduction du niveau d'expression d'ARNm de $K_V4.3$, du niveau d'expression protéique de $K_V4.3$ et $K_V1.5$ et de densité du courant K^+ sortant à rectification retardée ultrarapide (I_{Kur}).^{33, 39} Ainsi, il semble que les changements électrophysiologiques qui se produisent chez les patients atteints de fibrillation auriculaire sont principalement dus à une réduction des canaux calciques de type L, d' I_{K1} et d' $I_{K,ACh}$ alors que la réduction d'expression des canaux potassiques codant pour les courants sortant pourrait servir à adapter les cardiomyocytes aux fréquences rapides et à compenser le raccourcissement de la période réfractaire.³³

D'autres études ont évalué l'effet d'une stimulation électrique rapide chronique des oreillettes sur la vitesse de conduction et la densité du courant sodique (I_{Na}). Gaspo et *al.* ont trouvé une réduction de la densité d' I_{Na} qui corrélait avec un ralentissement de la vitesse de conduction.⁴⁰ D'autre part, après avoir induit de la fibrillation auriculaire par stimulation électrique rapide des oreillettes dans un modèle de chèvre, des chercheurs n'ont pas observé de changement de vitesse de conduction, mais ils ont remarqué une distribution hétérogène des connexines 40 (Cx40) au niveau des oreillettes sans altération du niveau d'expression d'ARNm ni d'expression protéique des connexines 40.⁴¹ Ainsi, ceci suggère que l'hétérogénéité de distribution des connexines, plutôt que leur sous- ou

surexpression, pourrait jouer un rôle important dans la susceptibilité de la fibrillation auriculaire.³³ En effet, une récente étude a montré qu'autant chez les patients insuffisants cardiaques que chez les souris soumises à une constriction de l'aorte transverse, l'expression protéique des connexines 43 (Cx43) dans les myocytes ventriculaires était inchangée lorsque comparés à leur groupe contrôle respectif. C'est plutôt la distribution hétérogène accrue des Cx43 qui a été associée à une plus grande susceptibilité aux arythmies ventriculaires.⁴²

Le lien entre l'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire

L'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire coexistent fréquemment et chacune de ces conditions est un facteur prédisposant à la survenue de l'autre.⁴³ L'insuffisance cardiaque est le facteur déterminant le plus important de développer la fibrillation auriculaire, avec un risque six fois plus important que chez les patients sans insuffisance cardiaque.⁴⁴ De plus, on estime que le fardeau socio-économique causé par la fibrillation auriculaire et l'insuffisance cardiaque continuera d'augmenter¹⁵ dû au vieillissement de la population et un meilleur taux de survie post-infarctus.⁴⁴ La prévalence de la fibrillation auriculaire chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque augmente avec la sévérité de leurs symptômes: 4% chez les patients de classe NYHA I, 27% chez les patients de classe NYHA II à III et 50% chez les patients de classe NYHA IV.⁴⁵

Plusieurs des maladies qui prédisposent à l'insuffisance cardiaque, comme l'hypertension, le diabète, les maladies coronariennes aiguës, les maladies valvulaires, l'obésité et l'apnée du sommeil, sont également des facteurs de risque de développer la fibrillation auriculaire.^{13,20,21}

Malgré un traitement optimal, la survenue de fibrillation auriculaire est souvent accompagnée par une décompensation cardiaque et une détérioration de la classe fonctionnelle des patients insuffisants cardiaques.⁴⁶ Une analyse rétrospective de l'étude SOLVD impliquant plus de 4200 patients insuffisants cardiaques a montré que la présence de fibrillation auriculaire est associée avec une augmentation significative des risques de mortalité de 32%, de mortalité liée à une défaillance cardiaque de 48% et d'hospitalisation liée à une décompensation d'insuffisance cardiaque de 38%.⁴⁷ L'effet de

la fibrillation auriculaire sur la mortalité chez les patients insuffisants cardiaques est toutefois controversé. Dans l'étude COMET, une sous-analyse menée chez des patients avec une FEVG réduite a montré que la présence de fibrillation auriculaire au départ n'était pas associée à un pire pronostic, mais que la survenue de fibrillation auriculaire de novo augmentait significativement le risque de mortalité.⁴⁸ Par contre, une récente méta-analyse a conclu que les patients atteints d'insuffisance cardiaque qui ont également de la fibrillation auriculaire ont un risque de mortalité accrue, autant chez les patients avec une FEVG réduite qu'avec une FEVG préservée.⁴⁹

L'état des patients avec une dysfonction systolique ou diastolique du ventricule gauche peut s'aggraver lors d'épisodes de fibrillation auriculaire. Normalement, la systole auriculaire peut contribuer jusqu'à 25% du débit cardiaque. Cependant, dans un contexte de dysfonction ventriculaire, cette contribution peut représenter jusqu'à 50% du débit cardiaque. Or, la survenue de fibrillation auriculaire abolit le « kick auriculaire », réduisant davantage le débit cardiaque et la tolérance à l'exercice.⁴⁶ De plus, la survenue de fibrillation auriculaire diminue le débit cardiaque et aggrave l'état des patients insuffisants cardiaques par d'autres mécanismes. Tout d'abord, la fibrillation auriculaire peut causer de la régurgitation valvulaire, réduisant le flot sanguin. Ensuite, la fréquence ventriculaire rapide qui survient lors d'épisodes de fibrillation auriculaire non contrôlées mène à un remplissage ventriculaire sous-optimal et une diminution du volume d'éjection systolique.⁵⁰

Les changements pathophysiologiques qui surviennent chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque et de fibrillation auriculaire sont complexes et ne sont pas complètement élucidés. L'insuffisance cardiaque cause plusieurs changements qui résultent en une conduction ralentie au niveau des oreillettes ou une augmentation de l'hétérogénéité de la repolarisation auriculaire qui favorise le développement et le maintien de la fibrillation auriculaire. Ces changements incluent des altérations hémodynamiques et neurohormonales, ainsi qu'un remodelage cellulaire et extracellulaire.⁴⁵ Par exemple, l'augmentation de la pression et du volume auriculaire qui survient chez les patients insuffisants cardiaques peut résulter en l'étirement des tissus et prédisposer à la fibrillation auriculaire en altérant la durée des périodes réfractaires. Une étude menée chez le chien a montré que l'étirement des oreillettes résulte à un

raccourcissement des périodes réfractaires, une prolongation du temps de conduction auriculaire et une susceptibilité accrue aux arythmies.⁵¹ Une étude réalisée chez le lapin a montré que la dilatation auriculaire résulte en une diminution de la vitesse de conduction ainsi qu'une augmentation de blocs de conduction auriculaire.⁵²

Par ailleurs, le système nerveux autonome semble également jouer un rôle dans le remodelage cardiaque caractéristique de l'insuffisance cardiaque qui prédispose à la fibrillation auriculaire. Une étude a montré qu'il semblait y avoir une augmentation de l'innervation parasympathique dans les oreillettes de chien atteint d'insuffisance cardiaque induit par stimulation électrique ventriculaire. L'emploi d'atropine pour bloquer le stimulus parasympathique résulte en une diminution significative de la durée de la fibrillation auriculaire induite par stimulation électrique cardiaque, suggérant que l'activité parasympathique contribue au maintien de la fibrillation auriculaire.⁵³

L'insuffisance cardiaque induite par stimulation électrique ventriculaire peut également causer un remodelage des canaux ioniques cardiaques. Par exemple, Li et *al.* ont observé une augmentation de 45% de la densité du courant de l'échangeur $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (NCX) au niveau des oreillettes, ce qui pourrait favoriser la survenue de dépolarisation retardée (DAD). De plus, ils ont remarqué une baisse de la densité d' I_{CaL} ainsi que celle du courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}) et de la composante lente du courant K^+ à rectification retardée (I_{Ks}). Cependant, contrairement aux modèles de remodelage induit par stimulation électrique rapide des oreillettes où l'on observe une réduction de la durée du potentiel d'action, les auteurs n'ont pas observé d'effets sur la durée du potentiel d'action.⁵⁴ Par ailleurs, dans un modèle de lapin atteint d'insuffisance cardiaque induite par stimulation électrique rapide des ventricules, Chang et *al.* ont reporté que les cardiomyocytes de la veine pulmonaire étaient caractérisées par un potentiel membranaire de repos plus dépolarisé et par une plus grande susceptibilité aux EADs et DADs⁵⁵, de même que par une diminution des courants sodiques et calciques de type L.⁵⁶

De plus, de nombreux changements dans l'homéostasie calcique surviennent dans un modèle de chien atteint d'insuffisance cardiaque induit par stimulation électrique rapide des ventricules et favorisent l'initiation de la fibrillation auriculaire. Par exemple, on observe au niveau des myocytes provenant des oreillettes une augmentation de la

concentration diastolique de calcium intracellulaire, de la concentration de calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique et de l'amplitude du transient calcique ainsi qu'une réduction du raccourcissement cellulaire.⁵⁷

Le rôle du SRAA en insuffisance cardiaque et en fibrillation auriculaire

Le SRAA pourrait représenter une cible thérapeutique prometteuse pour prévenir la fibrillation auriculaire en réduisant, entre autres, la fibrose interstitielle cardiaque.⁵⁸ Goette et *al.* ont trouvé une augmentation de l'expression protéique d'AT₁R et une diminution de celle d'AT₂R, sans altération de leur niveau d'ARNm chez des patients atteints de fibrillation auriculaire.⁵⁹ L'activation d'AT₁R est responsable de la plupart des effets cardiovasculaires de l'angiotensine II. Le niveau d'expression d'AT₂R est très élevé chez le fœtus, mais diminue durant la vie adulte. Cependant, son expression peut être modulée par des états pathologiques tels que l'insuffisance cardiaque où son activation exerce un effet inhibiteur sur la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire. De plus, les effets médiés par l'activation d'AT₂R semblent être augmentés par l'emploi d'un antagoniste du récepteur à l'aldostérone.⁶⁰ Une réduction de l'expression d'AT₁R et une augmentation d'AT₂R pourraient ainsi être compensatoire et avoir pour but de ralentir la progression de la fibrose interstitielle induite par l'angiotensine II.⁵⁹ Il est intéressant de noter que le profil d'expression d'AT₁R et AT₂R durant la fibrillation auriculaire ressemble à celui observé dans les cas d'insuffisance cardiaque.^{61,62} De plus, la fibrillation auriculaire a été reliée à un polymorphisme du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, de l'angiotensinogène et d'AT₁R.⁶³ Ensuite, Domenighetti et *al.* ont montré que la surproduction de l'ANG II cardiaque résulte en de l'hypertrophie ventriculaire, une diminution de la contractilité⁶⁴ et une augmentation de l'incidence d'arythmie causée par une réduction de I_{K1}.⁶⁵

Plusieurs études cliniques supportent l'hypothèse que le SRAA joue un rôle important dans le développement de fibrillation auriculaire en présence d'insuffisance cardiaque. Une récente méta-analyse incluant 21 études et plus de 90 000 patients suggère que les IECAs et les ARAs diminuent l'incidence de fibrillation auriculaire chez les patients insuffisants cardiaques (RR 0.58, 95 % CI 0.39-0.87).⁶⁶ Cependant, deux récentes études prospectives, GISSI-AF et ACTIVE-I, n'ont pas montré une diminution

du taux de fibrillation auriculaire avec la prise de valsartan ni d'irbésartan, deux ARAs, chez des patients atteints de fibrillation auriculaire et à haut risque d'AVC respectivement.^{67,68} D'autre part, une sous-analyse de l'étude EMPHASIS-HF a indiqué que l'addition d'éplérénone, un antagoniste du récepteur à l'aldostérone, au traitement standard d'insuffisance cardiaque diminuait l'incidence de fibrillation ou de flutter auriculaire.⁶⁹ L'impact du spironolactone, un autre un antagoniste du récepteur à l'aldostérone, sur la récurrence de FA demeure controversé.^{70,71} Une récente sous-analyse de l'étude AF-CHF a montré que la spironolactone ne réduisait pas l'incidence de FA et qu'elle augmentait même le taux de mortalité cardiovasculaire à cause d'arythmies chez les patients atteints également d'insuffisance cardiaque.⁷² Par ailleurs, l'aliskiren, un inhibiteur direct de la rénine, pourrait être bénéfique, car il réduit l'activité arrhythmogénique de la veine pulmonaire dans un modèle de lapin.⁷³

Plusieurs études animales supportent aussi l'hypothèse que le SRAA joue un rôle important dans le développement de la fibrillation auriculaire en présence d'insuffisance cardiaque. En effet, l'insuffisance cardiaque induite par une stimulation électrique rapide des oreillettes dans un modèle de chien conduit au développement de fibrose interstitielle importante. Cependant, ces effets sont atténués lorsque les chiens sont traités cinq semaines oralement avec un IECA, mais pas lorsque traités avec la combinaison hydralazine-nitrate.⁷⁴ Pfeffer et *al.* ont trouvé qu'un traitement chronique de captopril, un IECA, a non seulement amélioré la survie des rats suite à l'induction d'un infarctus du myocarde par ligature de l'artère coronaire gauche, mais a aussi réduit la dilatation du ventricule gauche.⁷⁵ De plus, d'autres chercheurs ont observé que l'étirement mécanique des myocytes mène à une libération d'angiotensine II et que l'ajout d'un ARA supprime l'expression d'ARNm des gènes impliqués dans la réponse d'hypertrophie.⁷⁶

La fibrose auriculaire résulte d'une expression altérée des métalloprotéinases matricielles (MMPs) en réponse à un stress oxydatif ou inflammatoire.³² Une augmentation de l'activité des MMPs corrèle avec le degré de fibrose et la durée de fibrillation auriculaire.⁷⁷ Comme dans le cas de la fibrillation auriculaire, la fibrose joue un rôle important dans le remodelage ventriculaire observé en insuffisance cardiaque. Les MMPs sont également impliqués dans le développement de fibrose en insuffisance cardiaque. En effet, une augmentation de l'expression des MMPs corrèle avec la

transition entre l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque et est inversement corrélée avec la fonction ventriculaire.³²

Le potentiel d'action auriculaire chez la souris et les courants ioniques

Bien comprendre le potentiel d'action et les courants ioniques qui le composent est important pour étudier les changements qui surviennent lors de pathologies comme l'insuffisance cardiaque ou la fibrillation auriculaire. Les expériences de ce projet portent uniquement sur l'électrophysiologie des myocytes des oreillettes. Chez l'homme, le potentiel d'action auriculaire des myocytes se divisent en quatre phases :

- 1) phase 0, l'ouverture des canaux Na^+ qui laisse entrer les ions Na^+ et dépolarise la membrane,
- 2) phase 1, l'ouverture des canaux K^+ responsables du courant I_{to} qui laisse sortir très rapidement les ions K^+ ainsi que l'inactivation des courants Na^+ repolarisent partiellement la membrane,
- 3) phase 2, l'ouverture des canaux Ca^{2+} de type L responsables de l'entrée d'ions Ca^{2+} ,
- 4) phase 3, l'ouverture des canaux K^+ responsables du courant K^+ à rectification retardée (I_{Kr} et I_{Ks}) qui laisse sortir les ions K^+ et l'inactivation des courants Ca^{2+} repolarisent la membrane. L'ouverture des canaux K^+ responsables du courant à rectification entrante, I_{K1} , survient dans la portion terminale de la repolarisation.
- 5) phase 4, rééquilibration du gradient électrochimique membranaire par la pompe Na^+/K^+ -ATPase et l'échangeur sodium-calcium (NCX) ainsi que le maintien du potentiel membranaire de repos par I_{K1} .⁷⁸

La souris est un modèle fréquemment utilisé pour étudier l'influence de certaines pathologies sur l'électrophysiologie cardiaque. La ressemblance des courants responsables du potentiel d'action myocytaire entre l'homme et la souris favorise l'emploi de ce dernier comme modèle expérimental en plus de son faible coût. Cependant, il y a aussi des différences importantes à noter comme la durée du potentiel d'action plus courte, la fréquence cardiaque plus rapide chez la souris et des différences au niveau des courants potassiques par exemple. Le tableau qui suit résume les différences de courants potassiques responsables de la repolarisation auriculaire entre les

hommes et les souris. Les principales différences sont l'absence d' I_{Kr} et I_{Ks} chez la souris et l'absence d' I_{ss} chez l'homme.⁷⁹ Ainsi, la souris s'avère un modèle intéressant pour étudier les courants I_{to} , I_{Kur} et I_{K1} .

Tableau 1. Comparaison des courants potassiques présents dans les myocytes auriculaires entre la souris et l'homme⁷⁹

	Humain	Souris
I_{to}	Kv4.3	Kv4.2 et Kv4.3
I_{Kur}	Kv1.5	Kv1.5
I_{Kr}	HERG	
I_{Ks}	KvLQT1/minK	
I_{ss}		Kv2.1
I_{K1}	Kir2.1	Kir2.1
$I_{K,Ach}$	Kir3.1 et Kir 3.4	Kir3.1 et Kir 3.4

La souris transgénique surexprimant le récepteur de type 1 à l'angiotensine II spécifiquement au niveau des myocytes cardiaques

Comme le SRAA semble avoir un rôle clé dans le lien entre l'insuffisance cardiaque et la fibrillation auriculaire, les expériences ont été menées sur des souris transgéniques qui surexpriment AT_1R spécifiquement au niveau des myocytes cardiaques. Comme mentionné préalablement, il est connu que l'angiotensine II promouvoit l'hypertrophie, le remodelage et la fibrose cardiaque, en plus de causer un remodelage au niveau des courants ioniques responsable de la repolarisation des myocytes ventriculaires.^{65,80} Or, nous ignorons si l'angiotensine II a également un effet sur le remodelage électrique des myocytes auriculaires.

Ce modèle a été développé et caractérisé par l'équipe du Dre Mona Nemer sur un fond de souris C57BL/6.⁸¹ Ils ont observé chez ces souris de l'hypertrophie ventriculaire et auriculaire ainsi que de la fibrose (**Figure 1**), mais sans hypertension étant donné que la surexpression d' AT_1R était spécifique au cœur, grâce au promoteur de la chaîne lourde myosine α . Ainsi, ce modèle est très intéressant car il permet de cerner les effets de la surexpression d' AT_1R sur le remodelage des canaux ioniques cardiaques sans l'influence du remodelage cardiaque qui se développerait suite à de l'augmentation de la post-charge secondaire à une résistance vasculaire systémique accrue.

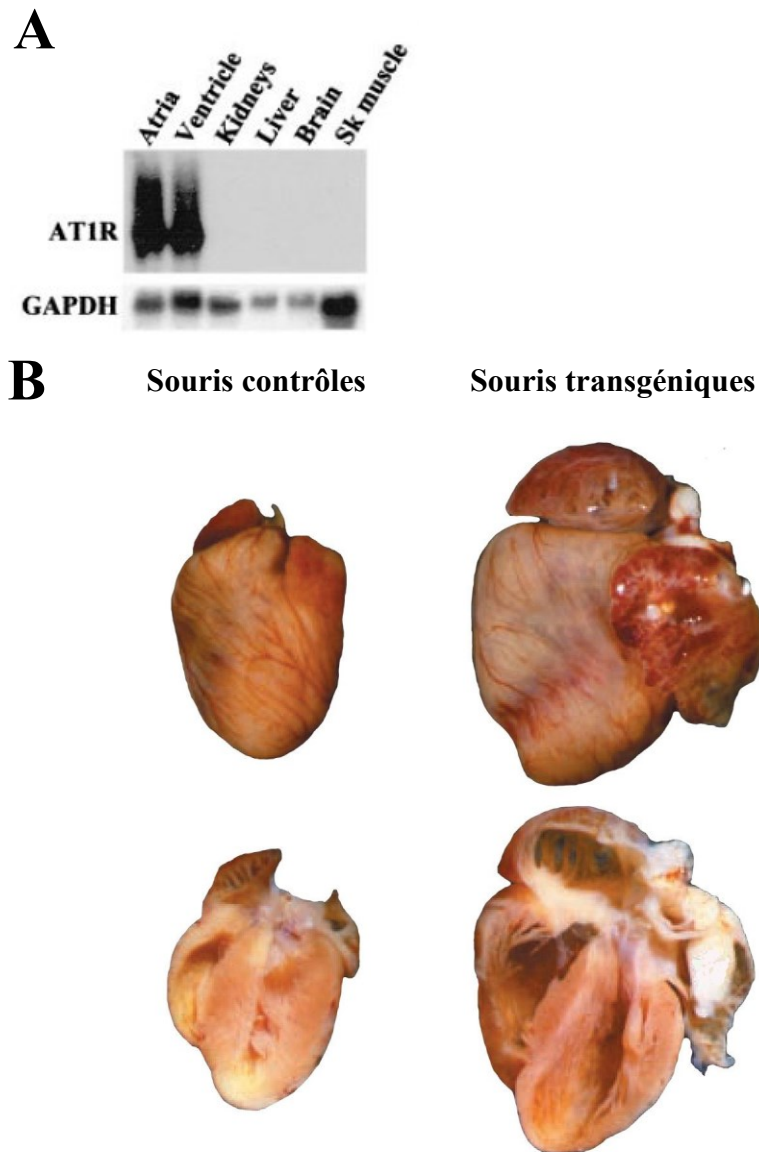


Figure 1. La souris AT_1R présente une surexpression du récepteur de type 1 à l'angiotensine II spécifiquement au niveau des myocytes cardiaques et est caractérisée par une hypertrophie auriculaire et ventriculaire. (A) Immunobuvardage de type « Northern » montrant l'expression d'ARN codant pour AT_1R spécifiquement au niveau des tissus cardiaques. (B) Cœurs de souris Ctl et AT_1R âgées de 27 jours montrant une hypertrophie significative des ventricules et des oreillettes ainsi qu'une présence accrue de fibrose. Adaptée de Paradis et *al.*⁸¹

Par ailleurs, en utilisant ce modèle, des étudiants précédents du laboratoire ont observé la présence de remodelage structurel chez les souris âgées de 180 jours, mais pas chez celles âgées de 50 jours.⁸⁰ Cette caractéristique a été exploitée pour distinguer les effets directs de la surexpression d'AT₁R des effets secondaires au remodelage cardiaque. En effet, on ne peut exclure que le remodelage structurel observé chez les souris âgées de 180 jours contribue aux changements des courants ioniques. Ils ont aussi montré une réduction d'I_{to} et d'I_{Kur} au niveau des myocytes ventriculaires associée à une prolongation de l'intervalle QTc et à des arythmies ventriculaires.⁸⁰ (**Figure 2A et B**) De plus, ils ont observé une altération des mécanismes responsables du couplage excitation-contraction : une réduction du raccourcissement cellulaire, du transient calcique, du contenu en calcium du réticulum sarcoplasmique et de la densité d'I_{CaL} associée à une baisse du niveau d'expression d'ARNm de Cav1.2.⁸² (**Figure 2C**) Ainsi, avec l'expertise de notre laboratoire sur la caractérisation des courants potassiques et calciques chez la souris, en particulier la souris transgénique qui surexprime AT₁R spécifiquement au niveau des myocytes cardiaques, nous avons entrepris d'étudier l'effet de la surexpression d'AT₁R sur la modulation des courants potassiques et calciques au niveau des myocytes auriculaires.

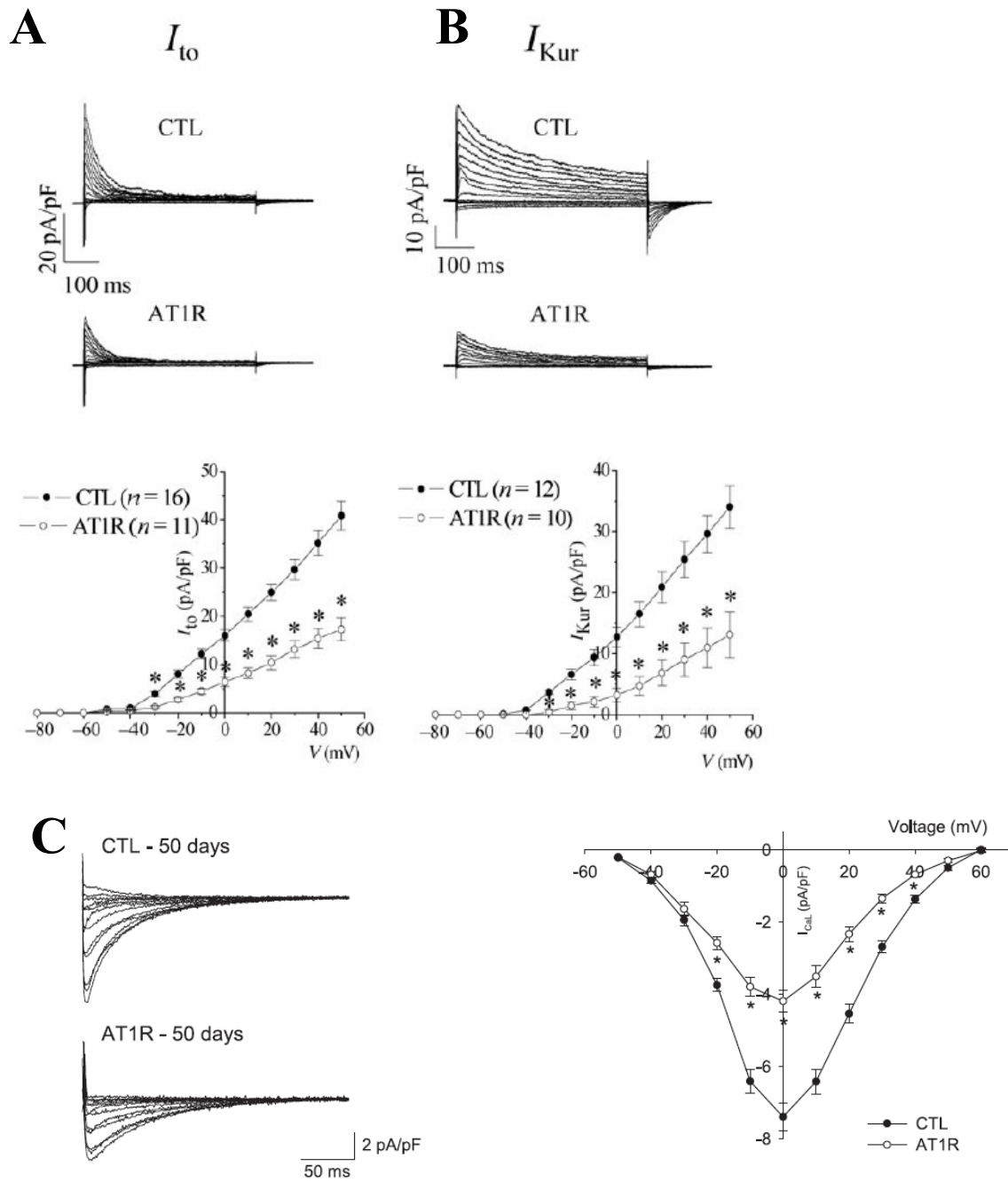


Figure 2. La surexpression d'AT₁R diminue la densité d' I_{to} , d' I_{Kur} et d' I_{CaL} dans les myocytes ventriculaires de souris âgées de 50 jours. Tracé représentatif d' I_{to} (A) et d' I_{Kur} (B) et d' I_{CaL} (C) d'un myocyte isolé d'oreillette de souris et courbe voltage-courant moyen pour I_{to} et I_{Kur} et d' I_{CaL} de myocytes auriculaires de souris transgéniques et contrôles âgées de 50 jours. Tiré de Rivard et *al.*^{80, 82}

Hypothèse

L'hypothèse de ce mémoire de maîtrise était que la surexpression d'AT₁R module les courants potassiques et calciques au niveau des myocytes auriculaires. Ceci mènerait à un changement de la durée du potentiel d'action auriculaire, à l'augmentation de l'hétérogénéité des périodes réfractaires contribuant ainsi au risque de réentrées et au déclenchement de la fibrillation auriculaire.

Objectifs

1. Le principal objectif de ce projet est de mesurer l'effet de la surexpression d'AT₁R sur les courants potassiques et calciques au niveau des myocytes auriculaires par la technique de patch-clamp
2. L'objectif secondaire de ce projet est de distinguer les effets directs de l'angiotensine II des effets secondaires au remodelage cardiaque

Méthodes

Des souris mâle C57BL/6 âgées de 50 ± 5 jours et de 6 à 8 mois (180 jours) de même que des souris contrôles (CTL) du même âge ont été utilisées lors des expériences. Toutes les expériences respectent les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux publiées par le « US National Institutes of Health » (NIH numéro de publication 85-23, révisé en 1996). Les expériences ont également été approuvées par le comité de déontologie animal de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

Isolation de myocytes auriculaires

La technique d'isolation provient d'un article publié par des étudiants précédents dans notre laboratoire.⁸³ Les souris ont d'abord été héparinées (100 U intra-péritonéale) 15 minutes avant le sacrifice afin de prévenir la coagulation sanguine lors de l'excision du cœur. Puis elles ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane et tuées par dislocation cervicale. Le cœur a été excisé le plus rapidement possible puis accroché par l'aorte sur une canule reliée à un système de perfusion Lagendorff. Ensuite, le cœur a été perfusé de manière rétrograde (2 ml/min) avec les solutions suivantes : 1) 3 à 5 minutes avec une solution de Tyrode composée de (en mM): 130 NaCl, 5,4 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0,33 Na₂HPO₄, 10 HEPES and 5,5 glucose (pH ajusté à 7,4 avec du NaOH); 2) 2 minutes avec une solution de Tyrode sans calcium; 3) 36 minutes pour les souris transgéniques et 34 minutes pour les souris CTL avec une solution de Tyrode composée de 0,03 mM Ca²⁺, 20 mM taurine, 0,1% BSA (Fraction V; Sigma Chemicals, St-Louis, MO), and 73,7 U/ml collagenase de type II (Worthington, Free-hold, NJ); et 4) 5 minutes 30 secondes avec une solution de Kraft-Brühe (KB) composée de (en mM) 100 K⁺-glutamate, 10 K⁺-aspartate, 25 KCl, 10 KH₂PO₄, 2 MgSO₄, 20 créatine base, 0,5 EGTA, 5 HEPES, 0,1% BSA et 20 glucose (pH ajusté à 7,4 avec du KOH). Les solutions ont été perfusées à une température contrôlée à 37 ± 1 °C. Par la suite, les oreillettes ont été séparées du cœur et placées dans la solution de KB. Enfin, elles ont été coupées en petits morceaux et triturées pendant 3 à 5 minutes pour obtenir des myocytes isolées. Ces myocytes ont été gardés dans du KB à 4°C jusqu'à utilisation ou pendant tout au plus six heures.

Électrophysiologie cellulaire

Les myocytes auriculaires isolés ont été placés sur une lamelle dans une chambre à perfusion au-dessus d'un microscope inversé. Avant de débiter la perfusion, nous avons attendu environ 10 minutes afin que celles-ci puissent adhérer au fond du bain.

La technique de patch-clamp en configuration cellule entière a permis la mesure des courants potassiques et calciques. Ces courants ont été mesurés à l'aide d'un amplificateur Axo-Patch 200B patch-clamp (Molecular Devices, Foster City, CA). pCLAMP 8,2 a été utilisé pour générer les protocoles et enregistrer les données. Les enregistrements ont été filtrés à 1kHz et digitalisés à 4 kHz. Les protocoles d'enregistrement et la composition des solutions employées sont tirés de papiers publiés par des étudiants précédents dans notre laboratoire.^{80,82} Enfin, une correction de -10 mV a été appliquée sur les enregistrements pour compenser le potentiel de jonction.

Pour les enregistrements des courants calciques, le bain a été maintenu à une température de 37 °C. Les myocytes ont été perfusés avec une solution composée (en mM) : 10 CsCl, 5,5 glucose, 0,5 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 HEPES and 145 TEACl (pH ajusté à 7,4 avec du CsOH). Les pipettes de patch sont faites de verre de borosilicate (WPI, Sarasota, FL) et présentaient une résistance de 2-4 MΩ lorsque remplies de la solution suivante (en mM): 100 acide aspartique, 70 CsOH, 40 CsCl, 2 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 10 EGTA et 10 HEPES (pH ajusté à 7,2 avec du CsOH). Aucune compensation n'a été appliquée et seules les cellules avec une résistance en série inférieure à 10 MΩ ont été considérées pour l'analyse.

Pour les enregistrements potassiques, la température du bain a été maintenue entre 20 et 22°C. Les myocytes ont été perfusés avec la solution de Tyrode. La solution interne est composée de (en mM): 110 K⁺-aspartate, 20 KCl, 8 NaCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 BAPTA, 4 K₂-ATP, and 10 HEPES (pH 7,2 avec du KOH). Les cellules ont été compensées entre 40% et 80% et seules les cellules ayant une résistance en série inférieure à 10 MΩ ont été considérées pour l'analyse.

L'emploi de protocoles d'électrophysiologie spécifiques a permis de distinguer les différents courants potassiques et calciques présents au niveau des oreillettes à l'aide de

leurs propriétés cinétiques distinctes. Rappelons que la portion sortante du courant potassique total (I_{peak}) correspond à la somme d' I_{to} , I_{Kur} et I_{ss} tandis qu' I_{K1} est responsable de la portion entrante d' I_{peak} . Ce dernier a été obtenu par une série de potentiels test de 500 ms variant de -110 mV à +50 mV par augmentation de 10 mV à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV à une fréquence de 0,1 Hz. Le courant rectifiant entrant (I_{K1}) a été mesuré à la fin des sauts de potentiels de 500 ms allant de -110 mV to -40 mV. Pour obtenir le courant K^+ transitoire sortant indépendant du Ca^{2+} (I_{to}), un prépulse (100 ms à -40 mV) précédant les potentiels tests servant à mesurer I_{peak} a été utilisé. Puis le courant I_{to} a été calculé en soustrayant les courants obtenus avec et sans le prépulse.

Le courant calcique de type L a été obtenu par une série de potentiels tests de 250 ms variant de -50 mV to +60 mV par augmentation de 10 mV à partir d'un potentiel de maintien de -90 mV et précédé par un prépulse de 50 ms à -50 mV pour inactiver les courants sodiques et le courant calcique de type T (I_{CaT}). Pour obtenir I_{CaT} , nous avons ensuite effectué une série de potentiels tests de 250 ms de -90 mV à +60 mV par augmentation de 10 mV et avons soustrait de ce courant les courants mesurés avec I_{CaL} .

La dépendance au voltage de l'inactivation à l'état d'équilibre d' I_{CaL} a été mesurée à l'aide d'un protocole à deux pulses. Le premier pulse est un pulse d'inactivation partant de -90 à 0 mV pour 500 ms. Puis ce pulse a été suivi d'un second pulse à 0 mV pendant 250 ms. L'amplitude des courants mesurés à chaque potentiel test a été normalisée par rapport à l'amplitude du courant maximal (I/I_{max}) et reportée sur un graphique en fonction des potentiels des pulse d'inactivation. Le lissage de courbe a été obtenu avec l'équation de Boltzmann: $I/I_{max} = 1 / [1 + \exp((V_m - V_{1/2})/k)]$, où $V_{1/2}$ représente le potentiel membranaire auquel 50% des canaux sont inactivés.

Pour étudier la réactivation après inactivation d' I_{CaL} , deux stimulations de 250 ms à 0 mV ont été appliquées. Ces stimulations étaient séparées par différents intervalles de temps (10, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 170, 220, 270, 350 et 530 ms). Le potentiel de maintien et le potentiel entre les deux stimulations étaient de -90 mV. Puis le rapport I_2/I_1 a été reporté en fonction de la durée de l'intervalle entre les deux stimulations, où I_1 et I_2 représentent l'amplitude des courants mesurés après la première et la seconde stimulation, respectivement. La fonction exponentielle simple a été employée pour lisser la courbe des données.

Réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR)

La technique du qPCR a été employée afin de mesurer la quantité totale d'ARNm dans les oreillettes des souris transgéniques et contrôles afin de pouvoir comparer l'effet de la surexpression d'AT₁R sur le niveau de transcription des canaux calciques. L'ARN total des oreillettes a été isolé à l'aide du protocole « RNeasyfibrous tissue kit » (QIAGEN) et traité avec du ADNase I (Fermentas) afin de prévenir la contamination par de l'ADN génomique. L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à l'aide du kit « Maxima Reverse Transcriptase enzyme » (Fermentas) et les amorces spécifiques pour les canaux calciques Ca_v1.2 et Ca_v1.3. Ensuite, la technique de qPCR a été employée en utilisant le kit « DyNAmoColor Flash SYBR Green qPCR » (Thermo Scientific) et le système PCR en temps réel (MX3005P QPCR system; Stratagene). Chaque échantillon a été analysé en triplicata et la quantité d'expression d'ARNm du gène d'intérêt a été rapporté à celle de deux gènes de référence (murine cyclophylline et 18S).⁸²

Tableau 2. Liste des amorces utilisées pour le qPCR

	Sens	Anti-sens
Ca _v 1.2	ACAACCTGGCTGATGCGGA	TCACTGGGCTGGAGGTCATC
Ca _v 1.3	TCCGAAGAGCCTGCATTGT	ATGCAGCAACAGTCCATACG
18S	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	GCACCACCACCCACGGAA
Cyclo	CCGATGACGAGCCCTTGG	GCCGCCAGTGCCATTATG
AT ₁ R	TGGTGGGAATATTTGCAAAC	GATGATGCAGGTGACTTTGG

Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés par une moyenne \pm SEM. Une valeur de p inférieur à 0,05 est considéré statistiquement significative. Un test de Student a été utilisés lorsqu'il y avait deux groupes de comparaison tandis qu'une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour comparer les concentrations plasmatique d'angiotensine II chez les souris transgéniques et contrôles âgées de 50 jours et de 180 jours obtenue par Elisa.

Résultats

Caractérisation du modèle transgénique

Afin de vérifier si la surexpression d'AT₁R au niveau des myocytes a bel et bien eu lieu, nous avons mesuré le niveau d'expression de l'ARNm d'AT₁R au niveau des myocytes isolés des oreillettes de souris transgéniques et contrôles âgées de 180 jours. Nous avons observé une surexpression du niveau d'ARNm codant pour AT₁R d'environ 500 fois chez les souris transgéniques par rapport aux souris contrôles (**Figure 3**).

Ensuite, nous avons comparé la capacitance des myocytes provenant des oreillettes de souris transgéniques et contrôles âgées de 180 jours et avons observé que la capacitance des cellules provenant des souris transgéniques ($54,0 \pm 1,8$ pF; $n = 36$) était plus grande que celle des souris contrôles ($48,4 \pm 1,7$ pF; $n = 28$; $p < 0,05$) (**Figure 4**). À 50 jours, il n'y a pas de différence significative entre la capacitance des myocytes auriculaires des souris transgéniques ($64,4 \pm 3,4$ pF; $n = 15$) et celle des souris contrôles ($58,9 \pm 2,5$ pF; $n = 16$; $p = 0,19$). La présence d'hypertrophie cellulaire au niveau des myocytes auriculaires chez les souris transgéniques uniquement âgées de plus de 180 jours est cohérente avec les données observées au niveau des myocytes ventriculaires.⁸⁰

De plus, nous avons mesuré les niveaux plasmatiques d'angiotensine II chez les souris transgéniques et contrôles âgées de 50 et 180 jours. La concentration d'angiotensine II plasmatique n'est pas significativement différente entre les souris transgéniques ($0,15 \pm 0,07$ ng/mL; $n = 3$) et les souris contrôles ($0,20 \pm 0,04$ ng/mL; $n = 5$) âgées de 50 jours, ni entre les souris transgéniques ($0,13 \pm 0,03$ ng/mL; $n = 6$) et les souris contrôles ($0,10 \pm 0,04$ ng/mL; $n = 6$) âgées de 180 jours (**Figure 5**). Nous nous attendions à observer une diminution de la concentration plasmatique d'angiotensine II suite à une régulation à la baisse de la synthèse d'angiotensine II en réponse à la surexpression d'AT₁R par un mécanisme de rétroaction négatif.

Les effets de la surexpression d'AT₁R sur les courants potassiques

Afin de déterminer si la surexpression d'AT₁R influence les courants potassiques au niveau des oreillettes de souris, nous avons mesuré les différents courants potassiques

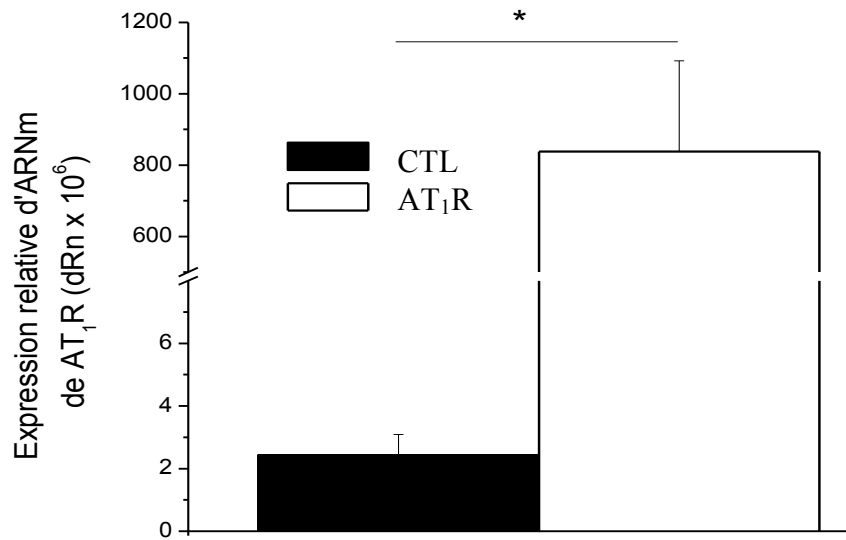


Figure 3. Expression relative d'ARNm d'AT₁R dans le tissu auriculaire de souris âgées de 180 jours. Le niveau de transcription d'ARNm codant pour AT₁R trouvé dans le tissu auriculaire de la souris transgénique (n = 4) est environ 500 fois plus élevé que chez la souris contrôle (n = 3) (*p < 0,05).

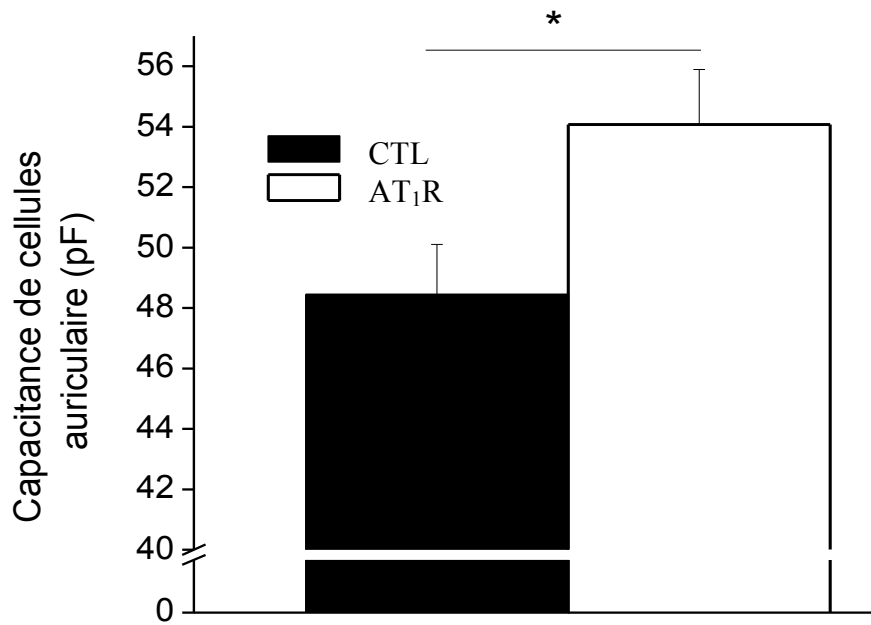


Figure 4. Capacitance cellulaire des myocytes d'oreillettes chez les souris transgéniques âgées de 180 jours. L'hypertrophie cellulaire est notée chez les myocytes auriculaires de souris transgéniques (n = 36) par rapport aux contrôles (n = 28) (*p < 0,05).

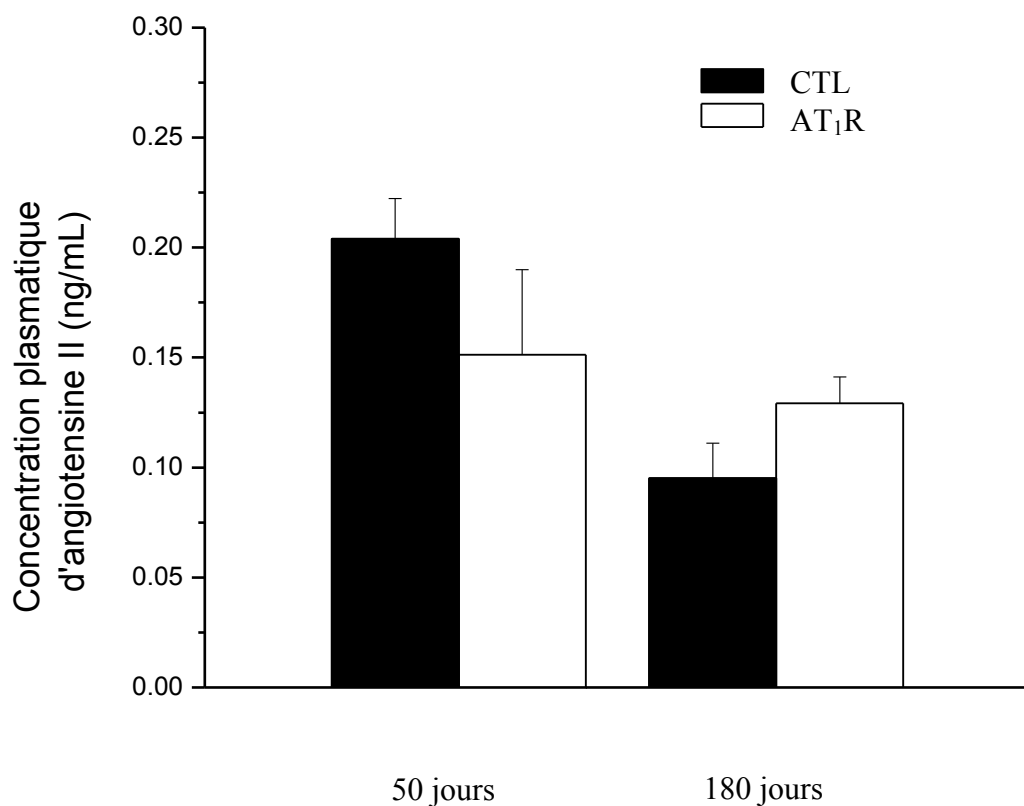


Figure 5. Concentration plasmatique d'angiotensine II chez les souris transgéniques et contrôles âgées de 50 jours et de 180 jours obtenue par Elisa. La concentration d'angiotensine II plasmatique n'est pas significativement différente entre les souris transgéniques (n = 3) et les souris contrôles (n = 5) âgées de 50 jours, ni entre les souris transgéniques (n = 6) et les souris contrôles (n = 6) âgées de 180 jours. Ces résultats ont été obtenus à l'aide du « Assay Max Human Angiotensin II Elisa Kit ».

qui sont responsables de la repolarisation auriculaire. De plus, comme il a déjà été rapporté dans la littérature que la densité du courant I_{Kur} était trois fois plus élevée dans les myocytes de l'oreillette gauche des souris C57BL/6 comparée à ceux de l'oreillette droite,⁸⁴ nous avons isolé les deux oreillettes et mesuré les courants potassiques dans chaque oreillette de manière indépendante. Sachant que l'oreillette gauche est particulièrement impliquée dans le remodelage observé en fibrillation auriculaire, nous voulions vérifier si la surexpression d'AT₁R affectait les courants ioniques auriculaires dans cette oreillette. Par ailleurs, pour confirmer les résultats obtenus par Lomax,⁸⁴ nous avons comparé les densités d' I_{peak} entre les oreillettes gauches et droites de souris contrôles mais n'avons pas trouvé de différence significative dans la densité de la portion sortante d' I_{peak} . (**Figure 6**) Ainsi, il semble selon nos résultats que la densité d' I_{Kur} est semblable entre les myocytes auriculaires gauches et droites. Nous avons cependant remarqué une plus faible densité d' I_{K1} dans l'oreillette gauche versus l'oreillette droite, mais celle-ci n'est pas remarquable à -80 mV.

Tout d'abord, au niveau de l'oreillette gauche, nous avons mesuré I_{peak} , dont la portion sortante est la somme d' I_{to} , d' I_{Kur} , et d' I_{ss} . Cependant, nous n'avons observé aucune différence significative de densité d' I_{peak} au niveau des myocytes auriculaires des souris âgées de 180 jours entre les souris transgéniques et contrôles (**Figure 7**). Ensuite, nous avons mesuré I_{Kslow} dont la portion sortante est la somme d' I_{Kur} , et d' I_{ss} . Nous avons obtenu I_{to} en soustrayant I_{Kslow} d' I_{peak} . En toute cohérence avec ce que nous avons observé avec I_{peak} , nous ne notons aucune différence dans la densité d' I_{to} des myocytes auriculaires entre les souris transgéniques et contrôles (**données non montrées**).

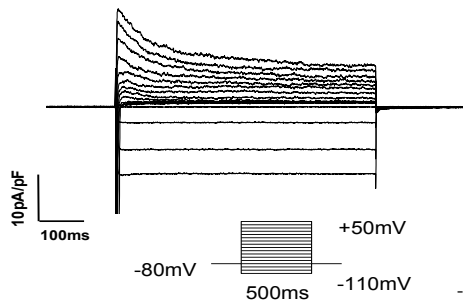
En examinant la portion entrante d' I_{peak} , qui se trouve à être I_{K1} , nous avons remarqué qu'au niveau de l'oreillette gauche, et non la droite, il y a une diminution significative de la densité de I_{K1} chez les souris transgéniques (à -110 mV; $-17,6 \pm 1,4$ pA/pF; $n = 18$) comparée aux contrôles ($-12,9 \pm 0,8$ pA/pF; $n = 8$; $p < 0,05$) (**Figure 7 et 8**). Par contre, cette différence de densité d' I_{K1} ne se reflète pas significativement sur le potentiel de repos membranaire; transgéniques ($-79,1 \pm 1,0$ mV; $n = 7$) et contrôles ($-77,3 \pm 1,0$ mV; $n = 15$). Ceci est en accord avec l'observation que la diminution de la densité d' I_{K1} chez les souris transgéniques est uniquement présente à des potentiels inférieurs à -

80 mV et que le potentiel de repos membranaire des myocytes se situe à environ -80 mV. En effet, aucune différence significative n'est observée entre le pic de la portion sortante d' I_{K1} entre les myocytes auriculaires des souris transgéniques (à -60 mV; $1,2 \pm 0,1$ pA/pF; n = 8) et contrôles ($1,5 \pm 0,2$ pA/pF; n = 15; p = 0,25) (**Figure 7**).

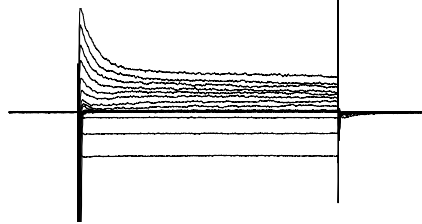
Souris contrôles

A

Oreillette gauche



Oreillette droite



B

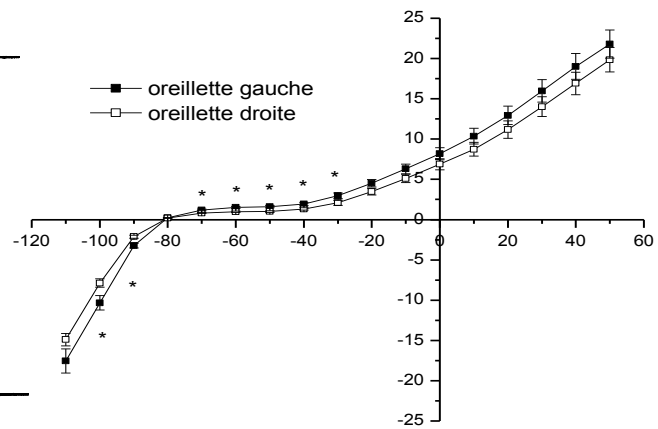


Figure 6. Absence de différence de densité de courant pour I_{peak} entre les myocytes d'oreillettes gauches et droites de souris contrôles, mais réduction de la densité de courant d'IK1 dans l'oreillette gauche. A) Tracé représentatif d'I_{peak} d'un myocyte isolé de souris contrôles d'oreillette gauche (haut) et droite (bas). (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{peak} de myocytes isolés d'oreillettes droites et gauches de souris contrôles. IK1 est réduit au niveau des myocytes de l'oreillette gauche (n = 17) comparée à celles de l'oreillette droite (n = 23) (*p < 0,05).

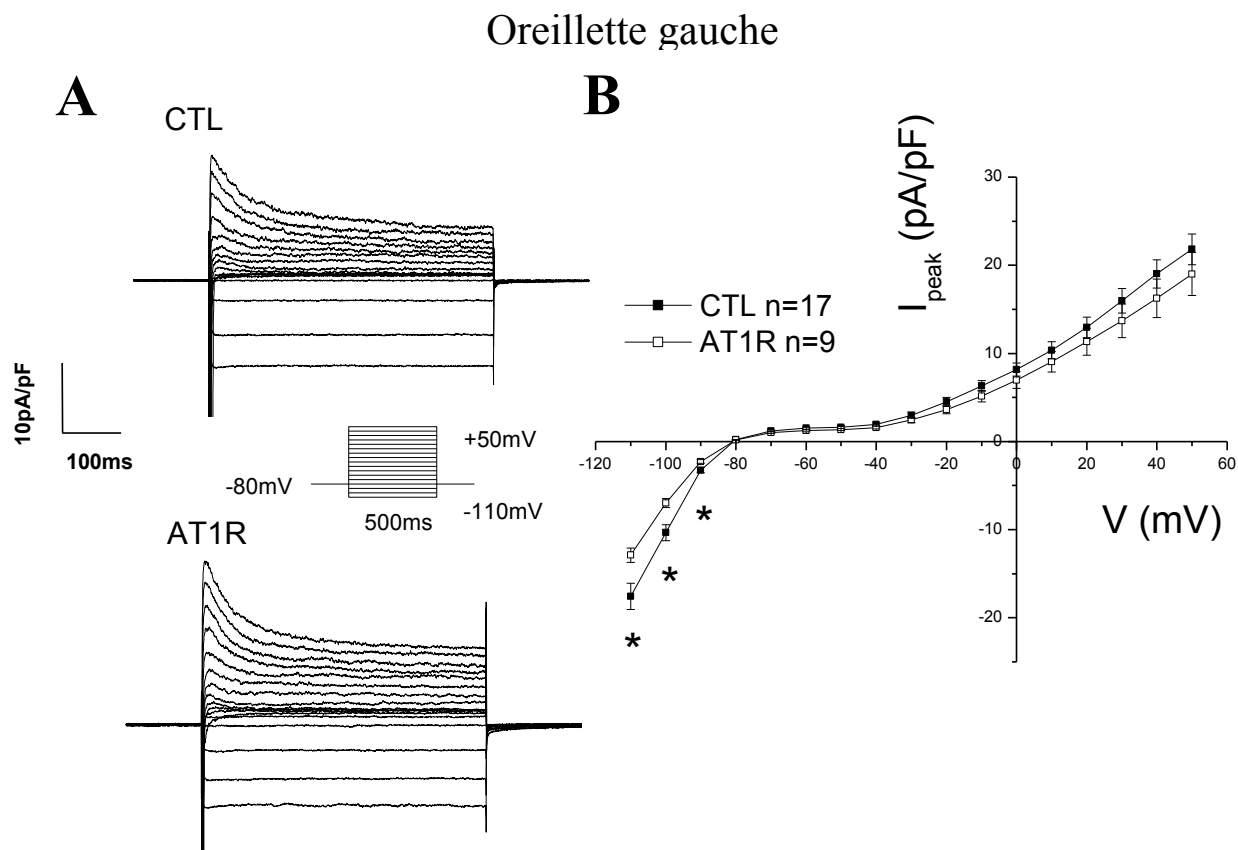


Figure 7. Réduction de la densité de courant d' I_{K1} au niveau des myocytes d'oreillettes gauches de souris transgéniques âgées de 180 jours. (A) Tracé représentatif d' I_{peak} d'un myocyte isolé d'oreillette gauche de souris contrôles (haut) et transgéniques (bas). (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{peak} de myocytes isolés d'oreillettes gauches de souris transgéniques (n = 18) et contrôles (n = 8) (*p < 0,05).

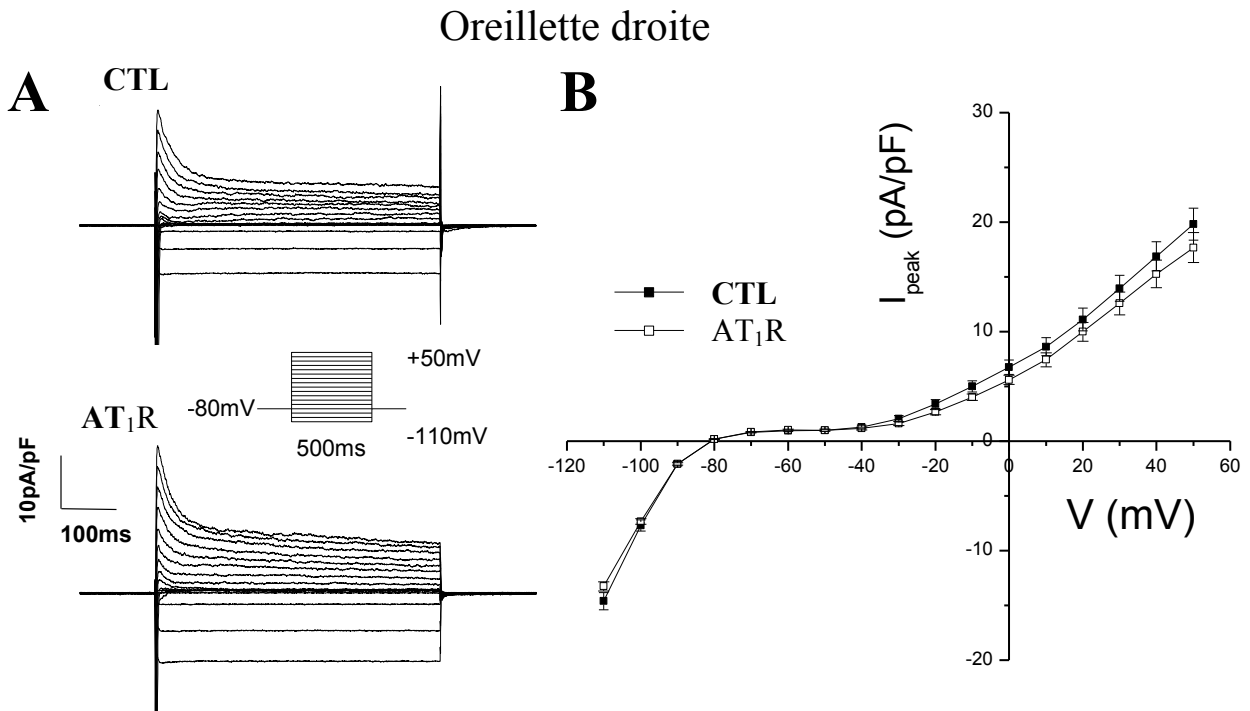


Figure 8. Absence de différence de densité de courant pour I_{peak} entre les myocytes d'oreillettes droites de souris transgéniques et contrôles âgés de 180 jours. (A) Tracé représentatif d' I_{peak} d'un myocyte isolé d'oreillette droite de souris contrôles (haut) et transgéniques (bas). (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{peak} de myocytes isolés d'oreillettes droites de souris transgéniques (n = 16) et contrôles (n = 24).

Les effets de la surexpression d'AT₁R sur les courants calciques

Afin de déterminer si la surexpression d'AT₁R influence les courants calciques au niveau des oreillettes de souris, nous avons mesuré les différents courants calciques qui sont responsables de l'entrée de calcium intracellulaire et du couplage excitation-contraction. En collaboration avec Fabrice Marger et Anh-Tuan Ton, deux étudiants du laboratoire, nous avons tout d'abord observé que la densité d'I_{CaL} est réduite à 180 jours chez les souris transgéniques (à 0 mV; $-3,6 \pm 0,2$ pA/pF; n = 27) comparées aux contrôles ($-5,4 \pm 0,4$ pA/pF; n = 30; p < 0,05) (**Figure 9**). Ensuite, pour déterminer si cette modulation ionique était présente avant la survenue du remodelage cardiaque, nous avons mesuré I_{CaL} chez les souris âgées de 50 jours. Nous n'avons pas noté de différence de densité d'I_{CaL} entre les myocytes auriculaires des souris transgéniques (à 0 mV; $-3,7 \pm 0,2$ pA/pF; n = 25) et contrôles âgées de 50 jours ($-4,2 \pm 0,3$ pA/pF; n = 21; p = 0,12) (**Figure 10**)

Par la suite, afin de mieux caractériser la différence de densité d'I_{CaL} observée chez les souris âgées de 180 jours, nous avons comparé les cinétiques d'activation, d'inactivation et de réactivation. On n'observe aucune différence de cinétique d'activation (contrôles: V_{1/2} = -19.6 mV; n = 29; transgéniques: V_{1/2} = -20.0 mV; n = 27) ni d'inactivation (contrôles: V_{1/2} = -41.0 mV; n = 24; transgéniques : V_{1/2} = -42.3 mV; n = 12) (**Figure 11A**). De même, on n'observe aucune différence dans la cinétique de réactivation (contrôles : Tau = 27.8 ± 4.5 s; n = 6; transgéniques : Tau = 42.1 ± 8.9 s; n = 6) (**Figure 11B**).

Ensuite, nous voulions vérifier si la diminution de densité d'I_{CaL} corrélait avec une baisse de la transcription de l'ARNm codant pour Ca_v1.2, la sous-unité α du canal calcique responsable d'I_{CaL}. Nous avons observé une diminution de la quantité relative d'ARNm codant pour Ca_v1.2 chez les souris transgéniques de 180 jours (**Figure 9C**), et non de 50 jours (**Figure 10C**) ce qui est cohérent avec les données de patch-clamp. Ainsi, ces données suggèrent que la surexpression d'AT₁R n'affecte pas directement la densité d'I_{CaL} au niveau des oreillettes, mais que le remodelage induit par celle-ci réduit la densité d'I_{CaL}.

Par ailleurs, nous avons mesuré l'effet de la surexpression d'AT₁R sur la densité d'I_{CaT} des myocytes auriculaires de souris. Bien que le rôle physiologique d'I_{CaT} n'est pas encore complètement élucidé,⁸⁵ son expression au niveau des myocytes ventriculaires augmente en présence d'hypertrophie cardiaque⁸⁶ et l'emploi d'un antagoniste spécifique à I_{CaT} réduit l'hypertrophie et la fibrose chez des rats ayant développé de l'insuffisance cardiaque suite à un infarctus du myocarde.⁸⁷ Ainsi, il semble pertinent de s'attarder aux effets de la surexpression d'AT₁R sur la densité d'I_{CaT} des myocytes auriculaires. Nous avons remarqué une diminution statistiquement significative de la densité d'I_{CaT} chez les souris transgéniques âgées de 50 jours (à -45 mV; $-0,7 \pm 0,1$ pA/pF, n = 13) versus les souris contrôles ($-1,4 \pm 0,1$ pA/pF n = 20; p < 0,05) (**Figure 12**). Cette différence est également présente chez les souris transgéniques âgées de 180 jours (à -45 mV; $-1,0 \pm 0,2$ pA/pF, n = 18) versus les souris contrôles ($-1,9 \pm 0,2$ pA/pF n = 28; p < 0,05) (**Figure 13**). Ainsi, ces données suggèrent que la surexpression d'AT₁R réduit directement la densité d'I_{CaT} au niveau des oreillettes et que cette réduction persiste suite au remodelage cardiaque.

Nous avons ensuite mesuré la quantité relative d'ARNm codant pour Ca_v3.2 au niveau des oreillettes, le canal responsable d'I_{CaT}, et nous avons constaté une baisse statistiquement significative du niveau de transcription de l'ARNm codant pour Ca_v3.2, ce qui est cohérent avec les données de patch-clamp (**Figure 12C et 13C**).

Différences de repolarisation mâles/femelles

Il existe de nombreuses différences dans l'électrophysiologie cardiaque entre les hommes et les femmes. Par exemple, les femmes ont un intervalle QT corrigé pour la fréquence cardiaque (QTc) plus long que les hommes.⁸⁸ De plus, la survenue de tachycardie supraventriculaire est deux fois plus fréquente chez les femmes, tandis que la prévalence de fibrillation est 1,5 à 2 fois plus élevée chez les hommes.^{88,89} Des études menées par les membres de notre laboratoire ont également montré plusieurs différences entre les mâles et les femelles. Plus particulièrement, ils ont montré que la densité d'I_{Kur} était plus grande chez les mâles que les femelles au niveau des myocytes ventriculaires⁹⁰ et que cette différence était explicable par un effet androgénique de la testostérone.⁹¹ Ainsi, afin de mieux caractériser les différences mâles/femelles au niveau de

l'électrophysiologie cardiaque, nous avons évalué les différences de repolarisation au niveau des oreillettes entre les souris mâles et femelles.

Nous n'avons pas trouvé de différences significatives de densité d' I_{peak} et d' I_{K1} entre les myocytes auriculaires des souris CD1 mâles et femelles (**Figure 14**).

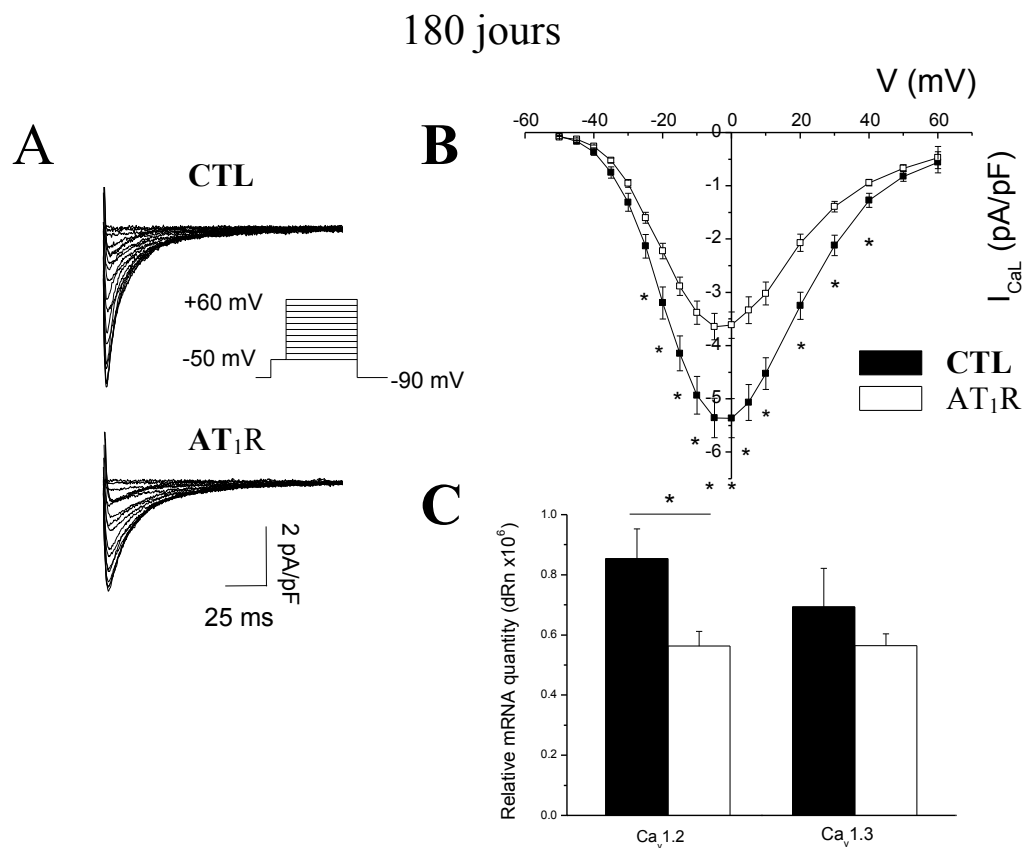


Figure 9. La surexpression d' AT_1R diminue la densité d' I_{CaL} et la quantité relative d'ARNm de $Ca_v1.2$ dans les myocytes auriculaires de souris âgées de 180 jours. (A) Tracé représentatif d' I_{CaL} d'un myocyte isolé d'oreillette de souris contrôles (haut) et transgéniques (bas) âgées de 180 jours. (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{CaL} de myocytes auriculaires de souris transgéniques âgées de 180 jours (à 0 mV; $-3,6 \pm 0,2$ pA/pF; $n = 27$) et contrôles ($n = 30$) (* $p < 0,05$). (C) Expression relative d'ARNm codant pour $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ au niveau des myocytes d'oreillettes de souris transgéniques âgées de 180 jours ($n = 3$) et contrôles ($n = 3$) (* $p < 0,05$).

50 jours

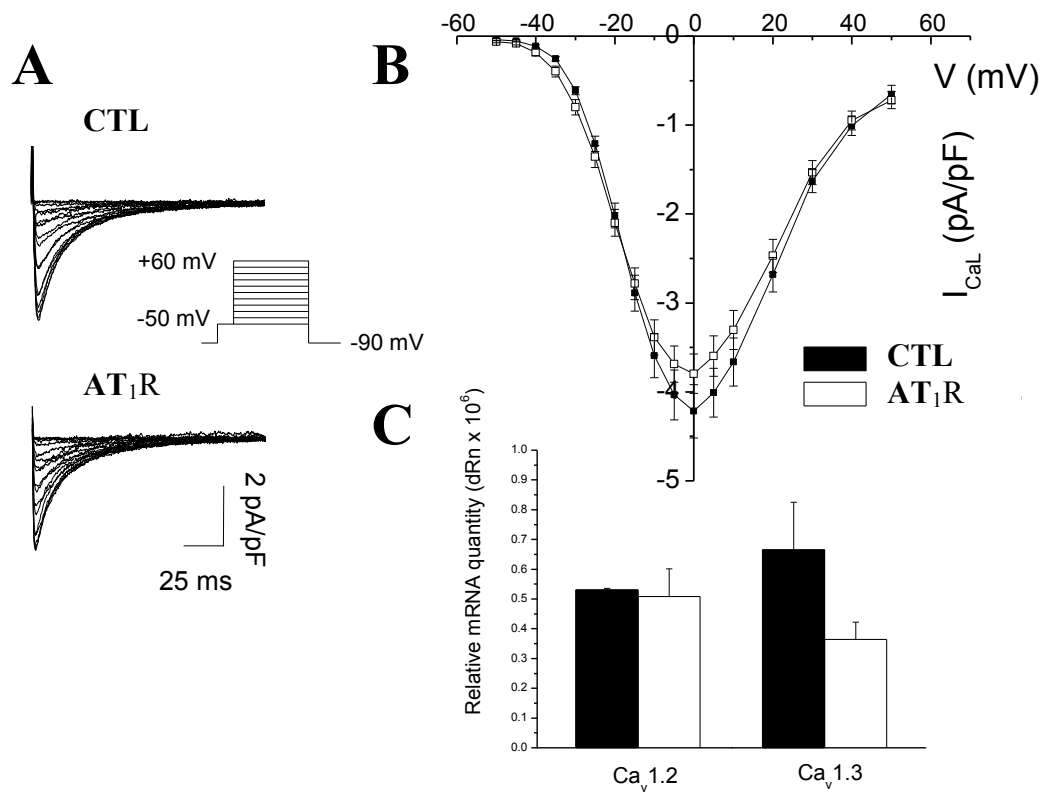


Figure 10. La surexpression d'AT₁R n'affecte pas la densité d' I_{CaL} ni la quantité relative d'ARNm de Ca_v1.2 et Ca_v1.3 dans les myocytes auriculaires de souris âgées de 50 jours. (A) Tracé représentatif d' I_{CaL} d'un myocyte isolé d'oreillette de souris contrôles (haut) et transgéniques (bas) âgées de 50 jours. (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{CaL} de myocytes auriculaires de souris transgéniques (n = 25) et contrôles (n = 21) âgées de 50 jours. (C) Expression relative d'ARNm codant pour Ca_v1.2 et Ca_v1.3 au niveau des myocytes d'oreillettes de souris transgéniques (n = 3) et contrôles (n = 3) âgées de 50 jours.

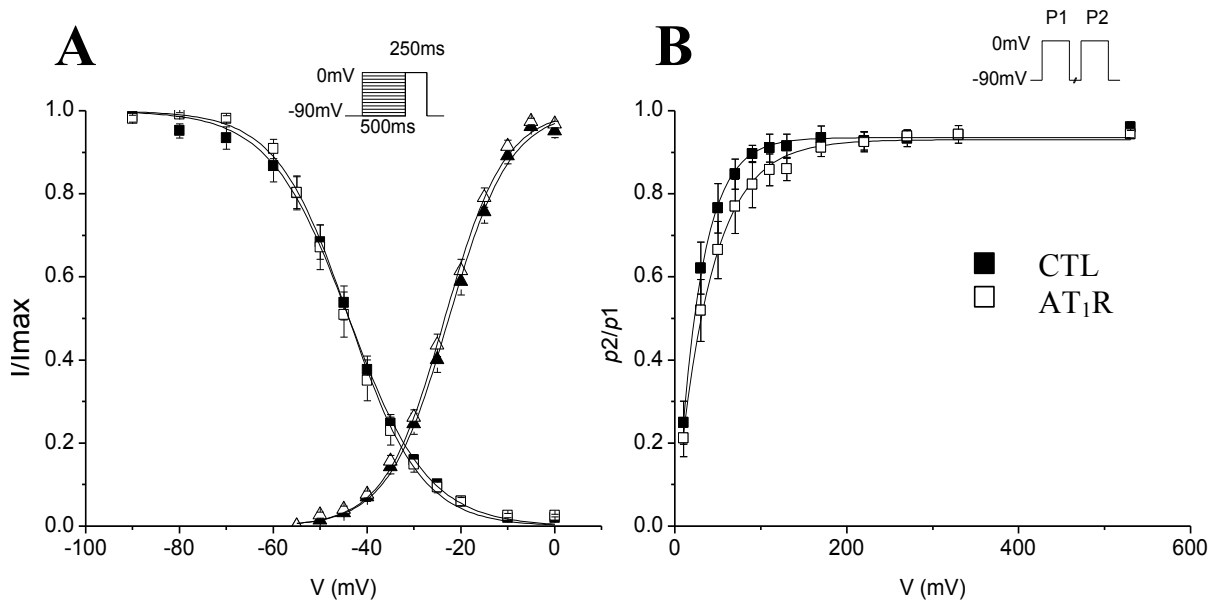


Figure 11. Absence de modulation des cinétiques d'activation et d'inactivation d' I_{CaL} au niveau des myocytes d'oreillettes chez les souris âgées de 180 jours entre les souris contrôles et transgéniques. (A) Courbes d'activation (triangles) et d'inactivation (carrés) chez les souris contrôles (noir) et transgéniques (blanc). On observe aucune différence de cinétique d'activation (contrôles $n = 29$; transgéniques $n = 27$) ni d'inactivation (contrôles $n = 24$; transgéniques $n = 12$). (B) Courbes de réactivation d' I_{CaL} . On observe aucune différence dans la cinétique de réactivation (contrôles $n = 6$; transgéniques $n = 6$).

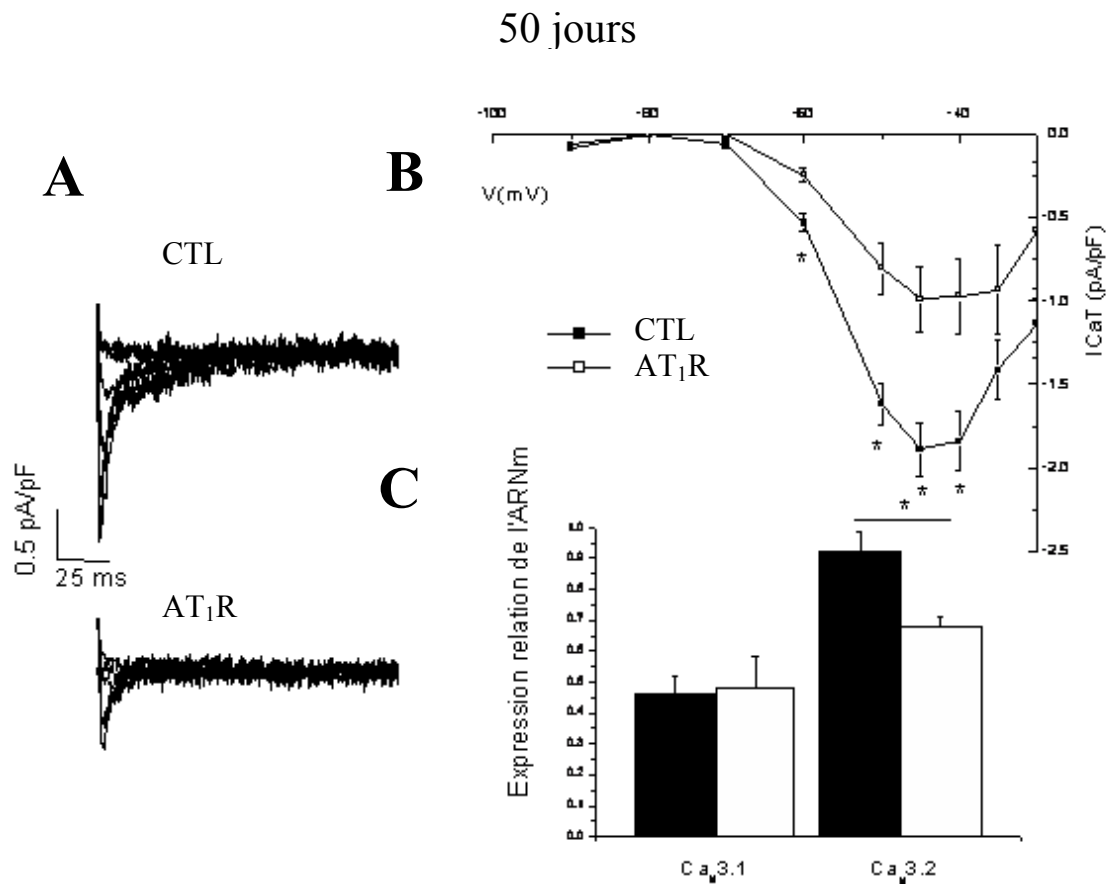


Figure 12. La surexpression d'AT₁R réduit la densité de courant d'I_{CaT} et la quantité relative d'ARNm de Ca_v3.2 dans les myocytes d'oreillettes de souris âgées de 50 jours. (A) Tracé représentatif d'I_{CaT} d'un myocyte isolé d'oreillettes d'une souris contrôle (haut) et transgénique (bas) âgée de 50 jours. (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{CaT} de myocytes auriculaires de souris transgéniques (n = 13) et contrôles (n = 20) âgées de 50 jours (*p < 0,05). (C) Expression relative d'ARNm codant pour Ca_v3.1 et Ca_v3.2 dans les oreillettes de souris transgéniques (n = 3) et contrôles (n = 3) âgées de 50 jours (*p < 0,05).

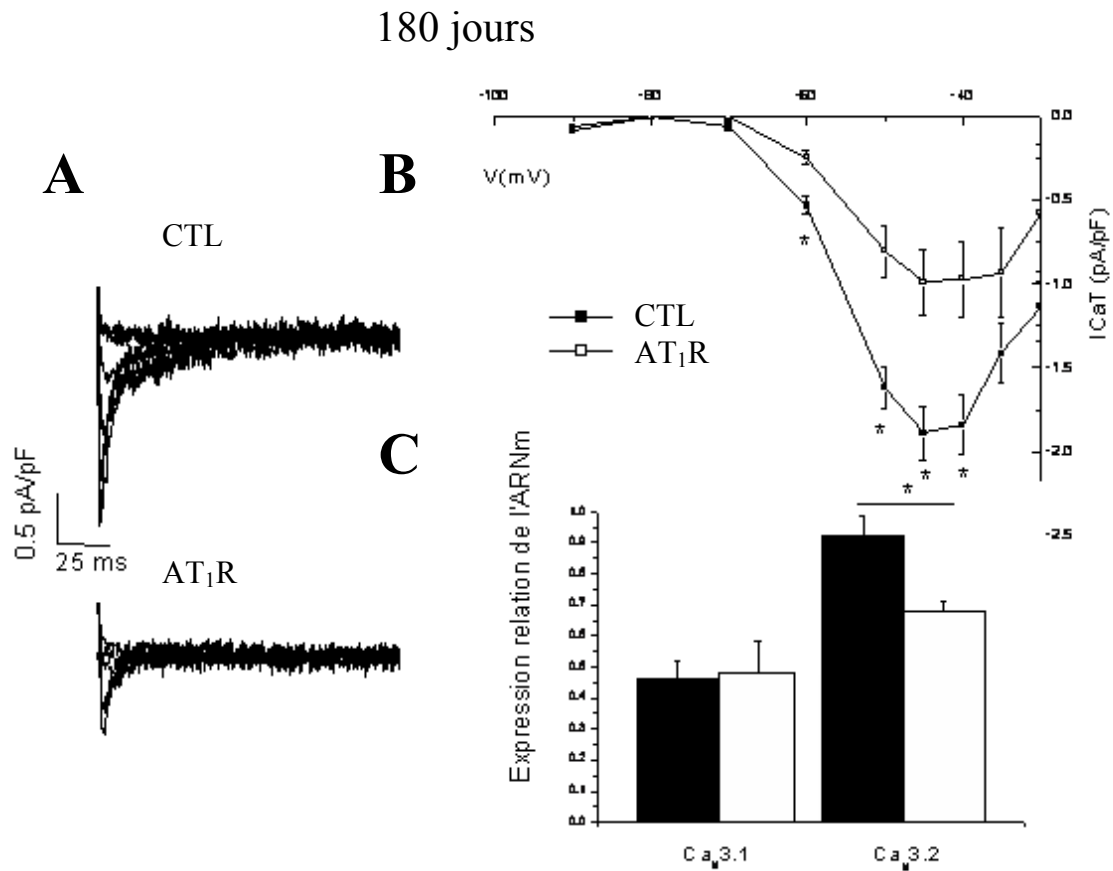


Figure 13. La surexpression d'AT₁R réduit la densité de courant d'I_{CaT} et la quantité relative d'ARNm de Ca_v3.2 dans les myocytes d'oreillettes de souris âgées de 180 jours. (A) Tracé représentatif d'I_{CaT} d'un myocyte isolé d'oreillettes d'une souris contrôle (haut) et transgénique (bas) âgée de 180 jours. (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{CaT} de myocytes auriculaires de souris transgéniques (n = 18) et contrôles (n = 28) âgées de 180 jours (*p < 0,05). (C) Expression relative d'ARNm codant pour Ca_v3.1 et Ca_v3.2 dans les myocytes d'oreillettes de souris transgéniques (n = 3) et contrôles (n = 3) âgées de 180 jours (*p < 0,05).

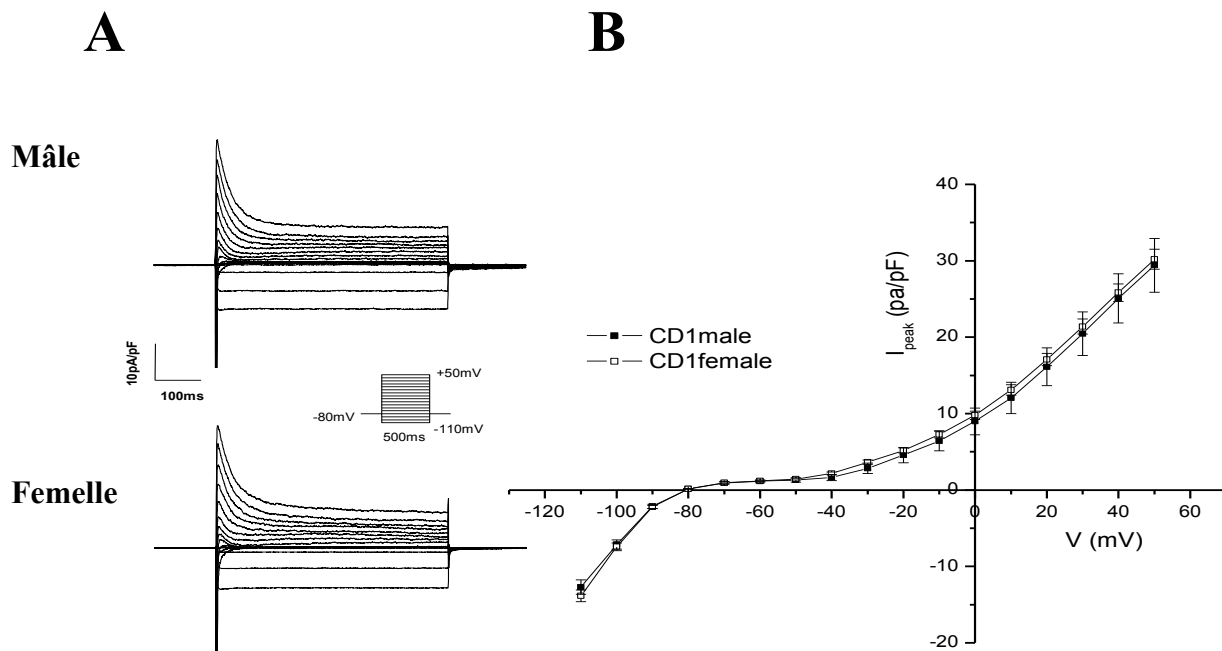


Figure 14. Absence de différence de densité d' I_{peak} entre les myocytes auriculaires de souris CD1 mâles et femelles. (A) Tracé représentatif d' I_{peak} d'un myocyte isolé d'oreillette de souris CD1 mâle (haut) et femelle (bas). (B) Courbe voltage-courant moyen pour I_{peak} de myocytes isolés d'oreillettes de souris mâles ($n = 13$) et femelle ($n = 26$).

Discussion

Résumé des principaux résultats

À la suite de nos expériences, nous avons observé les principaux résultats suivants. La surexpression d'AT₁R spécifiquement au cœur:

- 1) n'affecte pas la densité de la portion sortante du courant potassique global (I_{peak}) dans l'oreillette gauche ni dans l'oreillette droite;
- 2) réduit significativement I_{K1} dans l'oreillette gauche mais non dans l'oreillette droite chez des souris âgées de 180 jours. Le potentiel de repos membranaire n'est toutefois pas affecté dans les deux oreillettes;
- 3) n'affecte pas I_{CaL} chez les souris âgées de 50 jours (sans remodelage), mais réduit I_{CaL} chez celles âgées de 180 jours (avec remodelage). Cette réduction concorde avec une diminution d'expression relative d'ARNm qui code pour Ca_v1.2 chez les souris âgées de 180 jours. Aucun changement de cinétique d'activation ou d'inactivation n'est observé;
- 4) réduit significativement I_{CaT} chez les souris âgées de 50 et de 180 jours. Cette réduction corrèle avec une diminution d'expression relative d'ARNm qui code pour Ca_v3.2.

De plus, nous n'observons aucune différence d' I_{peak} entre les myocytes auriculaires de souris CD1 mâles vs femelles.

Le modèle AT₁R

Lorsque la capacité contractile du cœur est altérée ou réduite en réponse à un stimulus physiologique ou pathologique, il se produit un remodelage structurel et électrique incluant une hypertrophie cardiaque, associée avec une augmentation du nombre et/ou du volume myocytaire. L'hypertrophie pathologique préserve temporairement la fonction cardiaque et réduit le stress de la paroi ventriculaire. Cependant, une hypertrophie pathologique prolongée est un facteur prédicteur d'arythmies, de mort subite et d'insuffisance cardiaque. Autant chez les humains et que chez les animaux, le blocage du SRAA peut renverser l'hypertrophie cardiaque et ce,

indépendamment des effets sur la tension artérielle.⁹² C'est pourquoi notre modèle de souris transgéniques qui surexprime uniquement AT₁R au niveau des cardiomyocytes grâce au promoteur de la chaîne lourde myosine α est un modèle très pertinent pour comprendre les effets directs de l'angiotensine II sur l'électrophysiologie cardiaque. En effet, tel qu'observé dans la **Figure 1**, le tissu auriculaire de la souris transgénique est caractérisé par une augmentation de l'expression relative du niveau d'ARNm codant pour AT₁R. De plus, la souris transgénique développe une hypertrophie au niveau cellulaire tel que reflété par l'augmentation de la capacitance des myocytes auriculaire (**Figure 2**).

Par ailleurs, il aurait été intéressant de valider au niveau protéique qu'AT₁R soit bel et bien surexprimé en effectuant un buvardage de Western par exemple. De plus, mesurer le niveau d'expression d'ARNm et protéique d'AT₂R aurait aussi été pertinent, car il permettrait de s'assurer que les effets observés ne soient pas influencés par ce récepteur. En effet, rappelons que l'activation d'AT₂R inhibe la progression de la fibrose interstitielle⁶⁰ et que son expression augmente lors de remodelage cardiaque secondaire à une atteinte ischémique ou à une cardiomyopathie dilatée ou en présence de fibrillation auriculaire.⁵⁹⁻⁶² Or, nous ignorons si l'activation d'AT₂R peut moduler les courant K^+ et Ca^{2+} . Ainsi, s'il y a une augmentation de l'expression d'AT₂R secondaire au remodelage cardiaque induit par la surexpression d'AT₁R, peut-être que cela vient inhiber les effets observables d'AT₁R au niveau des courants K^+ et Ca^{2+} que nous avons mesuré.

L'effet de la surexpression d'AT₁R sur les courants potassiques

À notre connaissance, cette étude est la première à investiguer le rôle de l'angiotensine II sur les courants K^+ au niveau des oreillettes. Au niveau des myocytes ventriculaires de souris, la surproduction d'angiotensine II réduit I_{K1} ⁶⁵ tandis que la surexpression d'AT₁R réduit I_{to} , I_{Kur} et I_{K1} ⁸⁰. Nous observons que le remodelage cardiaque induit par la surexpression d'AT₁R n'affecte pas la densité de la portion sortante d' I_{peak} au niveau des oreillettes tel qu'observé chez les souris transgéniques âgées de 180 jours (**Figure 4 et 5**). Il est peu probable que la surexpression d'AT₁R affecte directement I_{peak} car un changement présent chez les souris transgéniques âgées de 50 jours persisterait probablement suite au remodelage, c'est-à-dire à 180 jours. Ainsi, nos résultats suggèrent que ce n'est pas en modulant la densité des courants K^+ sortants (I_{to} ,

I_{Kur} , I_{ss}) au niveau des oreillettes que l'angiotensine II augmente le risque de développer la fibrillation auriculaire.

De plus, de la même manière que Domenighetti et *al.* ont montré une diminution d' I_{K1} au niveau des myocytes ventriculaires de souris transgéniques qui surproduisent localement au cœur de l'angiotensine II⁶⁵ et que Rivard et *al.* ont aussi montré une diminution d' I_{K1} au niveau des myocytes ventriculaires de souris AT_1R^{80} , nous observons également une réduction significative d' I_{K1} mais au niveau des oreillettes gauches des souris AT_1R . (**Figure 4**). Domenighetti et *al.* ont pu associer cette réduction avec celle du niveau d'expression relative des sous-unités Kir2.1 and Kir2.2 tandis que Rivard et *al.* ont pu l'associer avec celle du niveau d'expression protéique de la sous-unité Kir2.1. Or, nous n'avons pas effectué de telles expériences dans ce projet. De manière intéressante, d'une part, l'augmentation d' I_{K1} est reconnue comme une conséquence du remodelage induit par la tachyarythmie et aussi comme un facteur contribuant au raccourcissement du potentiel d'action favorisant ainsi le phénomène de réentrées. De plus, l'augmentation d' I_{K1} hyperpolarise les cellules auriculaires inhibant ainsi l'inactivation voltage-dépendante du courant Na^+ favorisant davantage le phénomène de réentrées.⁹³ D'autre part, la diminution d' I_{K1} induite par le SRAA prolonge la phase tardive du potentiel d'action et favorise la survenue de dépolarisations retardées (« delayed afterdepolarization » ou DAD).⁶⁵ Ainsi, il semble qu'une modulation à la baisse ou à la hausse d' I_{K1} entraîne des modifications à la durée du potentiel d'action qui favorisent le déclenchement et le maintien de la fibrillation auriculaire. De plus, étant donné qu'à l'âge de 180 jours les souris transgéniques présentent un remodelage structurel, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer si la réduction observée d' I_{K1} est due au remodelage ou directement due à la surexpression d' AT_1R . Il faudra mesurer I_{K1} chez des souris âgées de 50 jours pour clarifier la situation.

Par ailleurs, comme Lomax et *al.*, nous avons observé une grande variabilité de densité de courant pour I_{to} .⁸⁴ Par exemple, certaines cellules dans le groupe de souris contrôles et transgéniques présentaient une densité d' I_{to} presque nulle alors que la plupart avait une densité d'environ 5 pA/pF à +30mV. Cette variabilité régionale est également observée dans d'autres modèles animaux comme le cochon d'Inde, le lapin et le chien.⁸⁴

Contrairement aux résultats de Lomax et *al.*, qui ont employé la même souche de souris, la souris C57BL/6, nous n'avons pas obtenu de différence statistiquement significative dans la portion sortante d' I_{peak} entre les myocytes d'oreillettes gauches et droites de souris contrôles malgré que les densités de courants que nous avons obtenues soient très similaires à celles qu'ils ont obtenues (**Figure 6**). Rappelons que Lomax et *al.* ont observé une réduction significative d' I_{Kur} et d' I_{K1} dans l'oreillette gauche versus la droite.⁸⁴ Ceci est associé à une réduction de la période réfractaire et de la durée de potentiel d'action au niveau de l'oreillette gauche. Ainsi, sachant que l'oreillette gauche se dépolarise après l'oreillette droite et qu'il se repolarise plus rapidement, cela permet aux deux oreillettes de se repolariser de manière synchronisée, maintenant ainsi une conduction auriculaire droite vers gauche normale.⁸⁴

Nous pensons que la raison pour laquelle nous n'observons pas de différence significative dans la portion sortante d' I_{peak} réside dans la très faible densité d' I_{Kur} . En effet, la densité d' I_{Kur} au niveau des oreillettes n'est que d'environ 5 pA/pF à +30 mV dans l'oreillette gauche comparativement à environ 30 pA/pF à +30 mV dans les myocytes ventriculaires. De plus, étant donné la très faible densité d' I_{Kur} au niveau auriculaire, l'erreur expérimentale affecte davantage les résultats obtenus.

Par ailleurs, comme mentionné auparavant, la région autour de l'orifice de la veine pulmonaire est capable de générer une activité électrique ectopique. Cette caractéristique pourrait favoriser la susceptibilité de l'oreillette gauche aux réentrées et ainsi à l'initiation et au maintien de la fibrillation auriculaire.⁸⁴ Il aurait été très intéressant d'isoler des cellules de cette région afin d'y caractériser les courants ioniques présents et de vérifier si la surexpression d' AT_1R les module. En effet, plusieurs études se sont intéressées à l'électrophysiologie des cardiomyocytes proche des veines pulmonaires chez différents modèles animales, dont le lapin⁹⁴ et le chien^{95,96}. Chez les chiens ayant subi un remodelage cardiaque par tachycardie auriculaire, on observe des modulations au niveau de certains courant ioniques dont I_{CaL} , I_{to} , I_{K1} et $I_{K,Ach}$.

L'effet de la surexpression d'AT₁R sur I_{CaL}

La surexpression d'AT₁R n'affecte pas directement la densité d'I_{CaL} au niveau des oreillettes, mais le remodelage induit par la surexpression d'AT₁R le réduit. Ces résultats diffèrent de ceux observés au niveau des ventricules où la surexpression d'AT₁R réduit directement I_{CaL}.⁸²

Plusieurs études ont montré l'impact de l'angiotensine II sur I_{CaL} dans différents tissus et modèles animaux. Par exemple, Sheng a observé une diminution d'I_{CaL} dans le nœud sinusal de cochons d'Inde après avoir appliqué 100 nM d'angiotensine II.⁹⁷ Habuchi a également trouvé que l'angiotensine II réduisait la densité d'I_{CaL} au niveau du nœud sinusal dans un modèle de lapin.⁹⁸ Par ailleurs, d'autres modèles d'hypertrophie sont caractérisés par une réduction d'I_{CaL}. Par exemple, un modèle de rat chez lequel on a induit une hypertrophie par surcharge volumique présente une densité d'I_{CaL} réduite au niveau des myocytes ventriculaires. De plus, un traitement de trois semaines avec le captopril, un IECA, a permis de renverser l'effet de l'hypertrophie sur la densité d'I_{CaL}.⁹⁹ Ainsi, les données provenant de la littérature appuient fortement que le SRAA régule I_{CaL}.

Par ailleurs, nos résultats soutiennent que la sous-unité α Ca_v1.2 contribue majoritairement à I_{CaL} dans les myocytes d'oreillettes de souris puisque la densité maximale observée d'I_{CaL} se situe à 0 mV (**Figure 6B et E**) et que la fluctuation de la quantité relative d'ARNm qui code pour Ca_v1.2 corrèle avec celle de la densité d'I_{CaL}. En effet, la densité maximale du courant associé à la sous-unité Ca_v1.3 se situe plutôt à -10 mV.¹⁰⁰ Ces données sont cohérentes avec celles de Marionneau et *al.* qui montrent une plus grande contribution de Ca_v1.2 au niveau des oreillettes et de Ca_v1.3 au niveau des nœuds sinusal et auriculo-ventriculaire.¹⁰¹

L'effet de la surexpression d'AT₁R sur I_{CaT}

Suite à une dépolarisation membranaire, il y a une entrée de Ca²⁺ par le canal Ca²⁺ de type L ce qui induit la relâche de Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique et initie la contraction cardiaque. Quant au canal Ca²⁺ de type T, il contribue à l'automaticité cardiaque et aussi au couplage excitation-contraction.¹⁰² Le canal Ca²⁺ de type T est exprimé durant la période embryonnaire mais sa densité diminue significativement durant

le développement. À l'âge adulte, les plus grandes densités d' I_{CaT} se retrouvent au niveau des cellules du système de conduction. L'expression d'ARNm de $Ca_v3.1$ est 30 fois plus importante dans les cellules du nœud sinusal que dans les myocytes auriculaires.¹⁰³ Il n'a pas encore été établi si I_{CaT} a un rôle fonctionnel dans les cellules d'oreillettes, de ventricules et du nœud sinusal dans le cœur humain en conditions physiologiques.⁸⁵

Le canal Ca^{2+} de type T est réexprimé lors de processus pathologiques comme l'hypertrophie cardiaque et l'infarctus du myocarde. Martinez et *al.* ont observé que dans un modèle de rat avec une hypertrophie cardiaque induite par sténose aortique abdominale, le canal Ca^{2+} de type T est réexprimé au niveau des ventricules.⁸⁶ De plus, Huang et *al.* a trouvé qu' I_{CaT} est présent au niveau des ventricules de rats néonataux, puis qu'il diminue à l'âge adulte et qu'il est réexprimé chez des rats adultes qui ont survécu un infarctus du myocarde.¹⁰⁴

Très peu est connu au sujet du rôle pathophysiologique d' I_{CaT} , mais il pourrait contribuer à la surcharge Ca^{2+} et à la survenue d'arythmies. L'emploi du mibéfradil, un antagoniste sélectif d' I_{CaT} , a réduit la mortalité chez les rats qui ont développé une insuffisance cardiaque post-infarctus du myocarde similairement au groupe traité avec un IECA. De plus, son emploi réduit l'hypertrophie et la fibrose observée dans le groupe contrôle.⁸⁷ Malheureusement, plusieurs événements indésirables graves comme un cas de torsades de pointe¹⁰⁵ et des cas de chocs cardiogéniques dus à des interactions médicamenteuses¹⁰⁶ chez des patients ont mené au retrait du médicament. Notons que le mibéfradil bloque de manière concentration-dépendante I_{Kr} favorisant ainsi l'allongement de l'intervalle QT.¹⁰⁷

Ferron et *al.* ont mené une étude chez des rats chez qui ils ont induit une hypertrophie cardiaque par sténose de l'aorte abdominale pendant 12 semaines. Ils ont remarqué une réexpression d' I_{CaT} dans le groupe ayant subi une sténose, mais pas dans le groupe contrôle. Ensuite, ils ont traité les rats avec du losartan, un ARA, pendant deux semaines et ils ont observé que la densité d' I_{CaT} a diminué d'environ la moitié comparativement au groupe avec de l'hypertrophie cardiaque. De plus, ils ont remarqué que le niveau d'expression d'ARNm de la sous-unité $Ca_v3.2$ n'est pas affecté par la sténose de l'aorte ni par le traitement au losartan, mais que le niveau d'expression de la sous-unité $Ca_v3.1$ augmente avec la sténose et revient à un niveau similaire au groupe

contrôle suite au traitement avec le losartan.¹⁰⁸ Ceci suggère que la régulation de l'expression d'ARNm de $Ca_v3.1$ durant l'hypertrophie induite par la sténose aortique est dépendante de l'angiotensine II. Ces résultats concordent avec celle d'une autre étude où l'angiotensine II exerce un effet hypertrophique dans les cardiomyocytes de rat et une augmentation d' I_{CaT} associée à une augmentation de l'expression d'ARNm de $Ca_v3.1$.¹⁰⁹ Ces deux études rapportent des résultats complètement opposés à ceux que nous observons dans notre modèle. En effet, nous observons une diminution de la densité d' I_{CaT} chez les souris transgéniques âgées de 50 jours et de 180 jours associée à une diminution du niveau d'expression de l'ARNm codant pour $Ca_v3.2$. De plus, nous n'avons pas vu d'effet de la surexpression d' AT_1R sur le niveau d'expression d'ARNm codant pour $Ca_v3.1$. Il se peut que la régulation d' I_{CaT} soit différente selon l'étiologie de l'hypertrophie, soit causée par la sténose aortique ou par la surexpression d' AT_1R . De plus, les études citées ont mesuré l'effet de l'angiotensine II au niveau des myocytes ventriculaires et non au niveau des oreillettes.

De manière intéressante, Chiang *et al.* ont montré que la sous-unité $Ca_v3.2$ jouait un rôle clé dans le développement de l'hypertrophie induite par surcharge de pression. En effet, ils ont observé que l'hypertrophie induite par la ligature de l'aorte transverse était supprimée chez des souris déficientes en $Ca_v3.2$, mais pas chez les souris déficiente en $Ca_v3.1$. De plus, ils ont observé que l'hypertrophie induite par un traitement chronique de deux semaines à l'angiotensine II était également absente chez les souris déficientes en $Ca_v3.2$. Enfin, ils ont montré que c'est par la voie de la calcineurine/NFAT que la signalisation menant à l'hypertrophie a lieu.¹¹⁰ L'étude de Chiang est très intéressante car elle permet de spéculer qu' I_{CaT} n'est pas seulement réexprimé dans certaines conditions pathologiques comme l'hypertrophie, mais qu' I_{CaT} joue aussi un rôle dans le développement de cette condition. Cependant, nos résultats ne supportent pas cette hypothèse puisque nous observons une diminution du niveau d'expression de l'ARNm codant pour $Ca_v3.2$ et de la densité d' I_{CaT} chez les souris AT_1R âgées de 50 et 180 jours.

Les différences de l'effet de l'angiotensine II entre les oreillettes et les ventricules

En comparant nos résultats avec ceux de Rivard *et al.*,⁸⁰ obtenus avec la même lignée de souris surexprimant AT_1R mais en étudiant les myocytes ventriculaires, nous

pouvons émettre comme hypothèse qu'il existe un mécanisme de régulation des courants ioniques par l'angiotensine II qui diffère selon les chambres du cœur. L'angiotensine II active AT₁R, un récepteur couplé aux protéines G, plus particulièrement G_{i/o} qui inhibe I_{CaL}.¹¹¹ Les protéines régulatrices de la signalisation des protéines G (RGS) sont des protéines qui modulent la réponse intracellulaire des protéines G. Il se pourrait qu'une expression hétérogène entre les oreillettes et les ventricules de certains isoformes cardiaques de RGS puisse expliquer cette différence de régulation.

En effet, Matsuzaki et *al.* ont trouvé une expression accrue de RGS2 au niveau des oreillettes par rapport aux ventricules chez les rats. De plus, ils ont montré que RGS2 inhibait l'effet de l'angiotensine II sur la réponse de Ca²⁺ intracellulaire.¹¹² Ensuite, Jean-Baptiste et *al.* ont montré une expression accrue de RGS5 au niveau des ventricules par rapport aux oreillettes de rats.¹¹³ De plus, Qin et *al.* ont observé une diminution des courants K⁺ au niveau des myocytes ventriculaires de souris C57BL/6 déficiente en RGS5. Puis, ils ont observé que les myocytes ventriculaires de souris contrôles mis en culture et traités avec de l'angiotensine II (0,1μM) pendant 24 heures présentaient une réduction d'I_{peak} et que cette réduction était accentuée chez les souris déficiente en RGS5. L'ajout d'un traitement avec le candesartan a permis d'inhiber les effets de l'angiotensine II sur les courants K⁺.¹¹⁴ Ainsi, il serait intéressant de mesurer les niveaux d'expression protéiques et d'ARNm de RGS2 et RGS5 au niveau des oreillettes et des ventricules dans notre modèle et de déterminer si la surexpression d'AT₁R affecte leur expression. Étant donné que la surexpression d'AT₁R réduit directement les courants K⁺ sortant au niveau des myocytes ventriculaires mais pas auriculaires, il se pourrait que la surexpression d'AT₁R augmente l'expression de RGS2 au niveau des oreillettes et qu'il réduise celle de RGS5 au niveau des ventricules.

Les différences mâles/femelles

Comme mentionné précédemment, il existe de nombreuses différences dans l'électrophysiologie cardiaque et la prévalence d'arythmies entre les hommes et les femmes. Par exemple, les femmes sont plus à risque de développer des torsades de pointes induites par des médicaments, la maladie du nœud sinusal tandis que les hommes

sont plus à risque de développer le syndrome de Brugada.¹¹⁵ Par ailleurs, il est connu que l'intervalle QTc des femmes est plus long que celui des hommes et que ces derniers ont un risque 1,5 à 2 fois plus élevé de développer la fibrillation auriculaire que les femmes.⁸⁹ Certains chercheurs ont montré que cette différence persistait même en bloquant le système nerveux autonome à l'aide de propanolol et d'atropine, suggérant une différence intrinsèque au cœur.¹¹⁶ D'ailleurs, il est rapporté qu'au niveau de la repolarisation ventriculaire, I_{Kur} est significativement réduit chez les souris femelles comparativement aux souris mâles et que cette diminution corrèle avec une baisse d'expression relative de $K_{V1.5}$ ⁹⁰ régulée positivement par le niveau d'androgènes⁹¹. Ainsi, l'objectif de cette partie du projet était de vérifier si la repolarisation auriculaire variait entre les souris CD1 mâles et femelles en lien avec l'incidence de fibrillation auriculaire accrue chez les hommes.

Notons que nous avons délibérément choisi de ne pas utiliser les souris C57BL/6 pour évaluer les différences de repolarisation mâles/femelles, mais plutôt les souris CD1, qui ont un niveau normal d'androgènes, car il a été rapporté que les souris mâles C57BL/6 sont considérés comme chroniquement déficients en androgènes vu leur niveau de testostérone sous les valeurs normales.⁹¹ Ainsi, sachant que la différence de repolarisation au niveau des myocytes ventriculaires entre les mâles/femelles concernait I_{Kur} et que celui-ci était régulé par la testostérone, nous avons opté d'étudier les souris CD1 en supposant qu'une différence de repolarisation auriculaire serait également dû aux androgènes.

Or, en analysant nos données (**Figure 9**) et celle d'un précédent étudiant du laboratoire, qui n'a observé aucune différence statistiquement significative d'expression d'ARNm des différents canaux potassiques au niveau des oreillettes entre des souris mâles et femelles CD1 (**données non publiées**), nous ne pouvons expliquer cette différence d'incidence de fibrillation auriculaire entre les hommes et les femmes par les propriétés des courants K^+ des myocytes auriculaires.

Peu d'études mécanistiques ont traité des différences mâles/femelles sur le plan électrophysiologique au niveau auriculaire.⁸⁸ Par exemple, Tsai et *al.* ont montré que les dépolarisations retardées (DAD) induites par l'isoprotérénol dans les veines pulmonaires de l'oreillette gauche de lapins mâles étaient plus importantes que dans celles de lapins

femelles.¹¹⁷ Une activité spontanée plus rapide ainsi qu'un potentiel membranaire de repos moins négatif au niveau des veines pulmonaires de lapins mâles sont des causes citées par les auteurs pour expliquer cette différence. Ainsi, il serait pertinent dans de futures études d'évaluer les facteurs prédisposant à la fibrillation auriculaire entre les mâles et les femelles en comparant leur niveau de fibrose, en mesurant I_{CaL} , I_{Na} , $I_{K,Ach}$, et l'expression des connexines 40 (Cx40) par exemple. Par ailleurs, il a été observé que parmi les patients avec une fibrillation auriculaire réfractaire aux médicaments anti-arythmiques et subissant une ablation par cathéter, les femmes étaient plus vieilles, avaient une histoire plus longue de fibrillation auriculaire et avaient plus de comorbidités.¹¹⁸ Cette étude renforce l'idée qu'il existe bel et bien une différence dans la pathophysiologie de la fibrillation auriculaire entre les hommes et les femmes.

Autres facteurs d'insuffisance cardiaque qui prédisposent à la fibrillation auriculaire

Dans le cœur, la propagation de l'influx électrique dépend d'un équilibre reposant sur l'interaction entre l'excitabilité, le couplage entre cellules et l'architecture du tissu cardiaque. La fibrose et les connexines sont des éléments importants de l'architecture du myocarde et déterminent le couplage entre les cellules dans les oreillettes. Les Cx40 sont des protéines de jonctions communicantes exprimées au niveau du tissu auriculaire et ayant pour rôle la dépolarisation coordonnée entre les myocytes. En effet, une étude menée sur des souris déficientes en Cx40 a démontré qu'elles étaient plus susceptibles de développer des arythmies auriculaires et que leur temps de conduction intra-auriculaire était prolongé.¹¹⁹ De plus, Firouzi et *al.* ont montré une association entre un polymorphisme au niveau des gènes codant pour Cx40 chez des humains et un risque accru de développer la fibrillation auriculaire.¹²⁰

Par ailleurs, une fibrose accrue réduit la vitesse de conduction et augmente l'hétérogénéité de conduction, deux facteurs qui prédisposent à la fibrillation auriculaire.¹²¹ De plus, l'angiotensine II et l'aldostérone influencent la production de collagène par les fibroblastes.¹²² Par exemple, chez la souris, un traitement chronique avec l'énalapril, un IECA, réduit la fibrose interstitielle de dix fois comparativement aux souris non traitées suite à un vieillissement naturel jusqu'à l'âge de 24 mois.¹²³ Une autre

étude a montré que la spironolactone, un antagoniste du récepteur à l'aldostérone, prévient le remodelage des jonctions communicantes et réduit la fibrose induite par la constriction de l'aorte transversale.¹²⁴ Ainsi, toutes ces études supportent le rôle du SRAA dans le développement de la fibrose et d'une altération de la conduction, deux facteurs clés dans la prédisposition à la fibrillation auriculaire. Cela expliquerait possiblement pourquoi tant d'études cliniques ont montré des effets bénéfiques de prévention de fibrillation auriculaire chez les patients insuffisants cardiaques prenant un IECA ou un ARA, malgré que l'angiotensine II ne semble pas directement affecter les courants K^+ et Ca^{2+} au niveau des oreillettes. Autrement dit, nous supposons que les agents pharmacologiques qui inhibent le SRAA chez les patients insuffisants cardiaques réduisent le risque de développer la fibrillation auriculaire en prévenant le remodelage structurel plutôt que le remodelage électrique. Ceci fait contraste avec les données publiées au niveau des ventricules, qui laissent plutôt supposer que le blocage du SRAA prévient directement le remodelage électrique.

Perspectives cliniques

En conclusion, la surexpression d'AT₁R n'affecte pas directement les courants K^+ et I_{CaL} au niveau des myocytes auriculaires suggérant que l'angiotensine II influence différemment les courants K^+ et les courants Ca^{2+} uniquement au niveau ventriculaire. En effet, nous savons que la surexpression d'AT₁R réduit I_{to} , I_{Kur} et I_{CaL} au niveau des myocytes ventriculaires, mais nos résultats ont montré qu'elle ne les affectait pas directement au niveau des oreillettes. Ceci suggère des mécanismes de régulation impliquant des voies de signalisation distinctes selon les chambres du cœur. Mieux comprendre ces mécanismes permettra peut-être de développer des médicaments plus sélectifs; par exemple, des agents antiarythmiques contre la fibrillation auriculaire qui n'augmentent pas le risque d'arythmies ventriculaires. De plus, l'importance de l'effet hétérogène de la surexpression d'AT₁R sur la densité d' I_{K1} entre les oreillettes gauche et droite ainsi que la pertinence de la réduction d' I_{CaT} restent à être clarifiées. Enfin, nos résultats montrant l'absence de l'influence directe de la surexpression d'AT₁R sur les canaux K^+ et Ca^{2+} au niveau des myocytes auriculaires renforcent l'importance d'approfondir nos connaissances sur les effets de l'angiotensine II sur le développement de la fibrose, sur le remodelage structurel et sur la conduction électrique cardiaque.

Bibliographie

- (1) Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2013 October 15;128(16):e240-e327.
- (2) Dipiro JT, Davis RE. New questions for pharmacists in the health care system. *Am J Pharm Educ* 2014 March 12;78(2):26.
- (3) Phac-aspc.gc.ca. 2009 Tracking Heart Disease and Stroke in Canada - Public Health Agency of Canada [Internet]. 2009 [cited 16 January 2015]. Available from: <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/2009/cvd-avc/index-eng.php>. 2015.
- (4) Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. *J Am Coll Cardiol* 1993 October;22(4 Suppl A):6A-13A.
- (5) He J, Ogden LG, Bazzano LA, Vupputuri S, Loria C, Whelton PK. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med* 2001 April 9;161(7):996-1002.
- (6) Kenchaiah S, Evans JC, Levy D et al. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 2002 August 1;347(5):305-13.
- (7) Shahar E, Whitney CW, Redline S et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 January;163(1):19-25.

- (8) Levy D, Kenchaiah S, Larson MG et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002 October 31;347(18):1397-402.
- (9) Loscalzo J. Keshan Disease, Selenium Deficiency, and the Selenoproteome. *New England Journal of Medicine* 2014 May 1;370(18):1756-60.
- (10) Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012 January 3;125(1):e2-e220.
- (11) Roger VL, Weston SA, Redfield MM et al. Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* 2004 July 21;292(3):344-50.
- (12) Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2010 February 23;121(7):e46-e215.
- (13) Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB, Levy D. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998 September 8;98(10):946-52.
- (14) Coyne KS, Paramore C, Grandy S, Mercader M, Reynolds M, Zimetbaum P. Assessing the direct costs of treating nonvalvular atrial fibrillation in the United States. *Value Health* 2006 September;9(5):348-56.
- (15) Go AS, Hylek EM, Phillips KA et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 2001 May 9;285(18):2370-5.
- (16) Savelieva I, Camm AJ. Clinical relevance of silent atrial fibrillation: prevalence, prognosis, quality of life, and management. *J Interv Card Electrophysiol* 2000 June;4(2):369-82.

- (17) Kannel WB, Benjamin EJ. Status of the epidemiology of atrial fibrillation. *Med Clin North Am* 2008 January;92(1):17-40, ix.
- (18) Mitchell GF, Vasan RS, Keyes MJ et al. Pulse pressure and risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 2007 February 21;297(7):709-15.
- (19) Aksnes TA, Schmieder RE, Kjeldsen SE, Ghani S, Hua TA, Julius S. Impact of new-onset diabetes mellitus on development of atrial fibrillation and heart failure in high-risk hypertension (from the VALUE Trial). *Am J Cardiol* 2008 March 1;101(5):634-8.
- (20) Wang TJ, Parise H, Levy D et al. Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* 2004 November 24;292(20):2471-7.
- (21) Kanagala R, Murali NS, Friedman PA et al. Obstructive sleep apnea and the recurrence of atrial fibrillation. *Circulation* 2003 May 27;107(20):2589-94.
- (22) Gaynor SL, Schuessler RB, Bailey MS et al. Surgical treatment of atrial fibrillation: predictors of late recurrence. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005 January;129(1):104-11.
- (23) Khan MN, Jais P, Cummings J et al. Pulmonary-vein isolation for atrial fibrillation in patients with heart failure. *N Engl J Med* 2008 October 23;359(17):1778-85.
- (24) Rostock T, Salukhe TV, Steven D et al. Long-term single- and multiple-procedure outcome and predictors of success after catheter ablation for persistent atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2011 September;8(9):1391-7.
- (25) Dobrev D, Carlsson L, Nattel S. Novel molecular targets for atrial fibrillation therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2012 April;11(4):275-91.
- (26) Marrouche NF, Brachmann J. Catheter ablation versus standard conventional treatment in patients with left ventricular dysfunction and atrial fibrillation

- (CASTLE-AF) - study design. *Pacing Clin Electrophysiol* 2009 August;32(8):987-94.
- (27) Fuster V, Ryden LE, Cannom DS et al. 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2011 March 15;123(10):e269-e367.
 - (28) Roy D, Talajic M, Dorian P et al. Amiodarone to prevent recurrence of atrial fibrillation. Canadian Trial of Atrial Fibrillation Investigators. *N Engl J Med* 2000 March 30;342(13):913-20.
 - (29) Maintenance of sinus rhythm in patients with atrial fibrillation: an AFFIRM substudy of the first antiarrhythmic drug. *J Am Coll Cardiol* 2003 July 2;42(1):20-9.
 - (30) Camm AJ. Safety considerations in the pharmacological management of atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2008 July 21;127(3):299-306.
 - (31) Hsu LF, Jais P, Sanders P et al. Catheter ablation for atrial fibrillation in congestive heart failure. *N Engl J Med* 2004 December 2;351(23):2373-83.
 - (32) McManus DD, Shaikh AY, Abhishek F, Vasan RS. Atrial fibrillation and heart failure parallels: lessons for atrial fibrillation prevention. *Crit Pathw Cardiol* 2011 March;10(1):46-51.
 - (33) Brundel BJ, Henning RH, Kampinga HH, Van Gelder IC, Crijns HJ. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002 May;54(2):315-24.
 - (34) Van Wagoner DR, Pond AL, Lamorgese M, Rossie SS, McCarthy PM, Nerbonne JM. Atrial L-type Ca^{2+} currents and human atrial fibrillation. *Circ Res* 1999 September 3;85(5):428-36.

- (35) Dobrev D, Friedrich A, Voigt N et al. The G protein-gated potassium current I(K,ACh) is constitutively active in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2005 December 13;112(24):3697-706.
- (36) Gaborit N, Steenman M, Lamirault G et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation. *Circulation* 2005 July 26;112(4):471-81.
- (37) Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of IK1 in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 December;287(6):H2790-H2802.
- (38) Cha TJ, Ehrlich JR, Chartier D, Qi XY, Xiao L, Nattel S. Kir3-based inward rectifier potassium current: potential role in atrial tachycardia remodeling effects on atrial repolarization and arrhythmias. *Circulation* 2006 April 11;113(14):1730-7.
- (39) Van Wagoner DR, Pond AL, McCarthy PM, Trimmer JS, Nerbonne JM. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* 1997 June;80(6):772-81.
- (40) Gaspo R, Bosch RF, Bou-Abboud E, Nattel S. Tachycardia-induced changes in Na⁺ current in a chronic dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* 1997 December;81(6):1045-52.
- (41) van der Velden HM, van Kempen MJ, Wijffels MC et al. Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998 June;9(6):596-607.
- (42) Boulaksil M, Winckels SK, Engelen MA et al. Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *Eur J Heart Fail* 2010 September;12(9):913-21.

- (43) Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004 August 31;110(9):1042-6.
- (44) Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA* 1994 March 16;271(11):840-4.
- (45) Maisel WH, Stevenson LW. Atrial fibrillation in heart failure: epidemiology, pathophysiology, and rationale for therapy. *Am J Cardiol* 2003 March 20;91(6A):2D-8D.
- (46) Lardizabal JA, Deedwania PC. Atrial fibrillation in heart failure. *Med Clin North Am* 2012 September;96(5):987-1000.
- (47) Dries DL, Exner DV, Gersh BJ, Domanski MJ, Waclawiw MA, Stevenson LW. Atrial fibrillation is associated with an increased risk for mortality and heart failure progression in patients with asymptomatic and symptomatic left ventricular systolic dysfunction: a retrospective analysis of the SOLVD trials. Studies of Left Ventricular Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 1998 September;32(3):695-703.
- (48) Swedberg K, Olsson LG, Charlesworth A et al. Prognostic relevance of atrial fibrillation in patients with chronic heart failure on long-term treatment with beta-blockers: results from COMET. *Eur Heart J* 2005 July;26(13):1303-8.
- (49) Mamas MA, Caldwell JC, Chacko S, Garratt CJ, Fath-Ordoubadi F, Neyses L. A meta-analysis of the prognostic significance of atrial fibrillation in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009 July;11(7):676-83.
- (50) Clark DM, Plumb VJ, Epstein AE, Kay GN. Hemodynamic effects of an irregular sequence of ventricular cycle lengths during atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 1997 October;30(4):1039-45.

- (51) Solti F, Vecsey T, Kekesi V, Juhasz-Nagy A. The effect of atrial dilatation on the genesis of atrial arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1989 October;23(10):882-6.
- (52) Eijssbouts SC, Majidi M, van ZM, Allessie MA. Effects of acute atrial dilation on heterogeneity in conduction in the isolated rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003 March;14(3):269-78.
- (53) Ng J, Villuendas R, Cokic I et al. Autonomic remodeling in the left atrium and pulmonary veins in heart failure: creation of a dynamic substrate for atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011 June;4(3):388-96.
- (54) Li D, Melnyk P, Feng J et al. Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology. *Circulation* 2000 June 6;101(22):2631-8.
- (55) Chang SL, Chen YC, Yeh YH et al. Heart failure enhances arrhythmogenesis in pulmonary veins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011 October;38(10):666-74.
- (56) Chang SL, Chen YC, Yeh YH et al. Heart failure enhanced pulmonary vein arrhythmogenesis and dysregulated sodium and calcium homeostasis with increased calcium sparks. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2011 December;22(12):1378-86.
- (57) Yeh YH, Wakili R, Qi XY et al. Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008 June 1;1(2):93-102.
- (58) Schneider MP, Hua TA, Bohm M, Wachtell K, Kjeldsen SE, Schmieder RE. Prevention of atrial fibrillation by Renin-Angiotensin system inhibition a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2010 May 25;55(21):2299-307.
- (59) Goette A, Arndt M, Rocken C et al. Regulation of angiotensin II receptor subtypes during atrial fibrillation in humans. *Circulation* 2000 June 13;101(23):2678-81.

- (60) Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res* 1998 December 14;83(12):1182-91.
- (61) Rogg H, de GM, Graedel E et al. Angiotensin II-receptor subtypes in human atria and evidence for alterations in patients with cardiac dysfunction. *Eur Heart J* 1996 July;17(7):1112-20.
- (62) Asano K, Dutcher DL, Port JD et al. Selective downregulation of the angiotensin II AT1-receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circulation* 1997 March 4;95(5):1193-200.
- (63) Tsai CT, Lai LP, Lin JL et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and atrial fibrillation. *Circulation* 2004 April 6;109(13):1640-6.
- (64) Domenighetti AA, Wang Q, Egger M, Richards SM, Pedrazzini T, Delbridge LM. Angiotensin II-mediated phenotypic cardiomyocyte remodeling leads to age-dependent cardiac dysfunction and failure. *Hypertension* 2005 August;46(2):426-32.
- (65) Domenighetti AA, Boixel C, Cefai D, Abriel H, Pedrazzini T. Chronic angiotensin II stimulation in the heart produces an acquired long QT syndrome associated with IK1 potassium current downregulation. *J Mol Cell Cardiol* 2007 January;42(1):63-70.
- (66) Huang G, Xu JB, Liu JX et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers decrease the incidence of atrial fibrillation: a meta-analysis. *Eur J Clin Invest* 2011 July;41(7):719-33.
- (67) Disertori M, Latini R, Barlera S et al. Valsartan for prevention of recurrent atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009 April 16;360(16):1606-17.
- (68) Yusuf S, Healey JS, Pogue J et al. Irbesartan in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2011 March 10;364(10):928-38.

- (69) Zannad F, McMurray JJ, Krum H et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011 January 6;364(1):11-21.
- (70) Dabrowski R, Borowiec A, Smolis-Bak E et al. Effect of combined spironolactone-beta-blocker +/- enalapril treatment on occurrence of symptomatic atrial fibrillation episodes in patients with a history of paroxysmal atrial fibrillation (SPIR-AF study). *Am J Cardiol* 2010 December 1;106(11):1609-14.
- (71) Williams RS, deLemos JA, Dimas V, Reisch J, Hill JA, Naseem RH. Effect of spironolactone on patients with atrial fibrillation and structural heart disease. *Clin Cardiol* 2011 July;34(7):415-9.
- (72) O'Meara E, Khairy P, Blanchet MC et al. Mineralocorticoid receptor antagonists and cardiovascular mortality in patients with atrial fibrillation and left ventricular dysfunction: insights from the Atrial Fibrillation and Congestive Heart Failure Trial. *Circ Heart Fail* 2012 September 1;5(5):586-93.
- (73) Tsai CF, Chen YC, Lin YK, Chen SA, Chen YJ. Electromechanical effects of the direct renin inhibitor (aliskiren) on the pulmonary vein and atrium. *Basic Res Cardiol* 2011 November;106(6):979-93.
- (74) Li D, Shinagawa K, Pang L et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 2001 November 20;104(21):2608-14.
- (75) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985 August;72(2):406-12.
- (76) Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993 December 3;75(5):977-84.

- (77) Xu J, Cui G, Esmailian F et al. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* 2004 January 27;109(3):363-8.
- (78) Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005 October;85(4):1205-53.
- (79) London B. Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001 September;12(9):1089-91.
- (80) Rivard K, Paradis P, Nemer M, Fiset C. Cardiac-specific overexpression of the human type 1 angiotensin II receptor causes delayed repolarization. *Cardiovasc Res* 2008 April 1;78(1):53-62.
- (81) Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 January 18;97(2):931-6.
- (82) Rivard K, Grandy SA, Douillette A et al. Overexpression of type 1 angiotensin II receptors impairs excitation-contraction coupling in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011 November;301(5):H2018-H2027.
- (83) Trepanier-Boulay V, Lupien MA, St-Michel C, Fiset C. Postnatal development of atrial repolarization in the mouse. *Cardiovasc Res* 2004 October 1;64(1):84-93.
- (84) Lomax AE, Kondo CS, Giles WR. Comparison of time- and voltage-dependent K⁺ currents in myocytes from left and right atria of adult mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003 November;285(5):H1837-H1848.
- (85) Ono K, Iijima T. Cardiac T-type Ca(2+) channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2010 January;48(1):65-70.
- (86) Martinez ML, Heredia MP, Delgado C. Expression of T-type Ca(2+) channels in ventricular cells from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1999 September;31(9):1617-25.

- (87) Mulder P, Richard V, Compagnon P et al. Increased survival after long-term treatment with mibefradil, a selective T-channel calcium antagonist, in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1997 February;29(2):416-21.
- (88) Tadros R, Ton AT, Fiset C, Nattel S. Sex differences in cardiac electrophysiology and clinical arrhythmias: epidemiology, therapeutics, and mechanisms. *Can J Cardiol* 2014 July;30(7):783-92.
- (89) Ghani A, Maas AH, Delnoy PP, Ramdat Misier AR, Ottervanger JP, Elvan A. Sex-Based Differences in Cardiac Arrhythmias, ICD Utilisation and Cardiac Resynchronisation Therapy. *Neth Heart J* 2011 January;19(1):35-40.
- (90) Trepanier-Boulay V, St-Michel C, Tremblay A, Fiset C. Gender-based differences in cardiac repolarization in mouse ventricle. *Circ Res* 2001 August 31;89(5):437-44.
- (91) Brouillette J, Rivard K, Lizotte E, Fiset C. Sex and strain differences in adult mouse cardiac repolarization: importance of androgens. *Cardiovasc Res* 2005 January 1;65(1):148-57.
- (92) van Berlo JH, Maillet M, Molkentin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest* 2013 January 2;123(1):37-45.
- (93) Wakili R, Voigt N, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011 August;121(8):2955-68.
- (94) Chen WT, Chen YC, Lu YY et al. Apamin modulates electrophysiological characteristics of the pulmonary vein and the Sinoatrial Node. *Eur J Clin Invest* 2013 September;43(9):957-63.
- (95) Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Chartier D, Leung TK, Nattel S. Atrial tachycardia remodeling of pulmonary vein cardiomyocytes: comparison with left atrium and potential relation to arrhythmogenesis. *Circulation* 2005 February 15;111(6):728-35.

- (96) Yeh YH, Qi X, Shiroshita-Takeshita A et al. Atrial tachycardia induces remodelling of muscarinic receptors and their coupled potassium currents in canine left atrial and pulmonary vein cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 2007 December;152(7):1021-32.
- (97) Sheng JW, Wang WY, Xu YF. Angiotensin II decreases spontaneous firing rate of guinea-pig sino-atrial node cells. *Eur J Pharmacol* 2011 June 25;660(2-3):387-93.
- (98) Habuchi Y, Lu LL, Morikawa J, Yoshimura M. Angiotensin II inhibition of L-type Ca^{2+} current in sinoatrial node cells of rabbits. *Am J Physiol* 1995 March;268(3 Pt 2):H1053-H1060.
- (99) Alvin Z, Laurence GG, Coleman BR, Zhao A, Hajj-Moussa M, Haddad GE. Regulation of L-type inward calcium channel activity by captopril and angiotensin II via the phosphatidyl inositol 3-kinase pathway in cardiomyocytes from volume-overload hypertrophied rat hearts. *Can J Physiol Pharmacol* 2011 March;89(3):206-15.
- (100) Mangoni ME, Couette B, Bourinet E et al. Functional role of L-type Cav1.3 Ca^{2+} channels in cardiac pacemaker activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 April 29;100(9):5543-8.
- (101) Marionneau C, Couette B, Liu J et al. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 2005 January 1;562(Pt 1):223-34.
- (102) Sipido KR, Carmeliet E, Van de Werf F. T-type Ca^{2+} current as a trigger for Ca^{2+} release from the sarcoplasmic reticulum in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 1998 April 15;508 (Pt 2):439-51.
- (103) Bohn G, Moosmang S, Conrad H, Ludwig A, Hofmann F, Klugbauer N. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* 2000 September 8;481(1):73-6.

- (104) Huang B, Qin D, Deng L, Boutjdir M, Sherif N. Reexpression of T-type Ca^{2+} channel gene and current in post-infarction remodeled rat left ventricle. *Cardiovasc Res* 2000 June;46(3):442-9.
- (105) Glaser S, Steinbach M, Opitz C, Wruck U, Kleber FX. Torsades de pointes caused by Mibefradil. *Eur J Heart Fail* 2001 October;3(5):627-30.
- (106) Mullins ME, Horowitz BZ, Linden DH, Smith GW, Norton RL, Stump J. Life-threatening interaction of mibefradil and beta-blockers with dihydropyridine calcium channel blockers. *JAMA* 1998 July 8;280(2):157-8.
- (107) Chouabe C, Drici MD, Romey G, Barhanin J, Lazdunski M. HERG and KvLQT1/IsK , the cardiac K^{+} channels involved in long QT syndromes, are targets for calcium channel blockers. *Mol Pharmacol* 1998 October;54(4):695-703.
- (108) Ferron L, Capuano V, Ruchon Y, Deroubaix E, Coulombe A, Renaud JF. Angiotensin II signaling pathways mediate expression of cardiac T-type calcium channels. *Circ Res* 2003 December 12;93(12):1241-8.
- (109) Morishima M, Wang Y, Akiyoshi Y, Miyamoto S, Ono K. Telmisartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, attenuates T-type Ca^{2+} channel expression in neonatal rat cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2009 May 1;609(1-3):105-12.
- (110) Chiang CS, Huang CH, Chieng H et al. The $\text{Ca}_v3.2$ T-type Ca^{2+} channel is required for pressure overload-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res* 2009 February 27;104(4):522-30.
- (111) Teschemacher AG, Seward EP. Bidirectional modulation of exocytosis by angiotensin II involves multiple G-protein-regulated transduction pathways in chromaffin cells. *J Neurosci* 2000 July 1;20(13):4776-85.

- (112) Matsuzaki N, Nishiyama M, Song D, Moroi K, Kimura S. Potent and selective inhibition of angiotensin AT1 receptor signaling by RGS2: roles of its N-terminal domain. *Cell Signal* 2011 June;23(6):1041-9.
- (113) Jean-Baptiste G, Li X, Yang Z et al. Beta adrenergic receptor-mediated atrial specific up-regulation of RGS5. *Life Sci* 2005 February 11;76(13):1533-45.
- (114) Qin M, Huang H, Wang T et al. Absence of Rgs5 prolongs cardiac repolarization and predisposes to ventricular tachyarrhythmia in mice. *J Mol Cell Cardiol* 2012 December;53(6):880-90.
- (115) Tadros R, Ton AT, Fiset C, Nattel S. Sex differences in cardiac electrophysiology and clinical arrhythmias: epidemiology, therapeutics, and mechanisms. *Can J Cardiol* 2014 July;30(7):783-92.
- (116) Burke JH, Goldberger JJ, Ehlert FA, Kruse JT, Parker MA, Kadish AH. Gender differences in heart rate before and after autonomic blockade: evidence against an intrinsic gender effect. *Am J Med* 1996 May;100(5):537-43.
- (117) Tsai WC, Chen YC, Lin YK, Chen SA, Chen YJ. Sex differences in the electrophysiological characteristics of pulmonary veins and left atrium and their clinical implication in atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2011 August;4(4):550-9.
- (118) Forleo GB, Tondo C, De LL et al. Gender-related differences in catheter ablation of atrial fibrillation. *Europace* 2007 August;9(8):613-20.
- (119) Hagerdorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 1999 March 23;99(11):1508-15.
- (120) Firouzi M, Ramanna H, Kok B et al. Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* 2004 August 20;95(4):e29-e33.

- (121) Stein M, Boulaksil M, Jansen JA et al. Reduction of fibrosis-related arrhythmias by chronic renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors in an aged mouse model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010 August;299(2):H310-H321.
- (122) Gonzalez A, Lopez B, Querejeta R, Diez J. Regulation of myocardial fibrillar collagen by angiotensin II. A role in hypertensive heart disease? *J Mol Cell Cardiol* 2002 December;34(12):1585-93.
- (123) Inserra F, Romano L, Ercole L, de Cavanagh EM, Ferder L. Cardiovascular changes by long-term inhibition of the renin-angiotensin system in aging. *Hypertension* 1995 March;25(3):437-42.
- (124) Qu J, Volpicelli FM, Garcia LI et al. Gap junction remodeling and spironolactone-dependent reverse remodeling in the hypertrophied heart. *Circ Res* 2009 February 13;104(3):365-71.